

## **NOTE TO USERS**

**Page(s) not included in the original manuscript are unavailable from the author or university. The manuscript was microfilmed as received.**

**36-43 & 45-52**

**This reproduction is the best copy available.**

**UMI<sup>®</sup>**

Université de Sherbrooke

Récepteur liant le facteur activateur de plaquettes : Étude de la désensibilisation à long  
terme par un agoniste ou un agoniste inverse

Par

Denis J. Dupré

Département de pédiatrie  
Service d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
En vue de l'obtention du grade de  
Philosophae doctor (Ph.D.) en immunologie

2 mai 2004

Les pages suivantes  
sont manquantes :  
p. 36 à 43  
et p. 45 à 52  
Document est  
correct tel quel.



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-494-00196-8*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-494-00196-8*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>v</b>
<b>CHAPITRE I – INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE II – ARTICLE .....</b>	<b>35</b>
Inverse Agonist Activity of Selected Ligands of Platelet-Activating Factor Receptor .....	36
<b>CHAPITRE III – ARTICLE .....</b>	<b>44</b>
Trafficking, Ubiquitination and Down-Regulation of the Platelet-Activating Factor Receptor .....	45
<b>CHAPITRE IV – ARTICLE .....</b>	<b>53</b>
Inverse Agonist-(WEB2086) Induced Signaling and Down-Regulation of the Platelet-Activating Factor Receptor .....	54
<b>CHAPITRE V – DISCUSSION .....</b>	<b>92</b>
<b>CHAPITRE VI – CONCLUSION .....</b>	<b>116</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>120</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>121</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT : Récepteur à la sérotonine

AA : Acide arachidonique

EBP50 : Ezrin-radixin-moesin binding phosphoprotein 50

EEAI : Early endosome auto-antigen I

EGF : Epidermal growth factor

FAK : Focal adhesion kinase

GPCR : Récepteur à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G

GPI : Glycophosphatidylinositol

GRK : Kinases spécifiques aux récepteurs couplés aux protéines G

GTP : Guanine triphosphate

IgE : Immunoglobuline de type E

JAK : Janus kinase/ FAK

KSHV : Kaposi syndrome herpes virus

LH : Hormone lutéinisante

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

NHERF : Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor

PAF : Facteur activateur de plaquettes, 1-0-alkyl-2-acétyl-sn-glycérophosphocholine

PAFR : Récepteur du facteur activateur de plaquettes

PDZ : PSD95/SAP90, DLG, ZO-1

PLA : Phospholipase A

PLC : Phospholipase C

PLD : Phospholipase D

PTH-PTHrP : Parathyroid hormone-parathyroid hormone related peptide

R : Conformation inactive du récepteur

R\* : Conformation active du récepteur

STAT : Signal transducers and activators of transcription

Tfn : Transferrine

TfnR : Récepteur de la transferrine

TSH : Thyroid Stimulating Hormone

WT : Type sauvage

Récepteur liant le facteur activateur de plaquettes : Étude de la désensibilisation à long  
terme par un agoniste ou un agoniste inverse

Par

Denis J. Dupré

Thèse présentée à la Faculté de médecine en vue de l'obtention  
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.) en immunologie  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

RÉSUMÉ

Le PAF est un médiateur phospholipidique ayant de nombreuses implications physiologiques et pathologiques. Suite à une stimulation, le récepteur du PAF peut activer différentes voies de signalisation. L'activation des voies de signalisation peut être inhibées par des antagonistes de structures distinctes. Certains antagonistes présentent des caractéristiques pharmacologiques particulières. Par exemple, les agonistes inverses ont la capacité de diminuer une réponse provenant d'une activation constitutive d'un GPCR. Le développement de récepteurs mutants possédant une activité constitutive représente un outil de recherche important puisque les caractéristiques des agonistes inverses sont souvent plus apparentes dans des systèmes exprimant une activité de base élevée. Les propriétés agonistes inverses de molécules antagonisant la réponse au PAF ont été révélées à l'aide de trois modèles d'activité basale élevée. Nos résultats

démontrent que diverses molécules peuvent agir en tant qu'agonistes inverses pour le récepteur mutant L231R et pour le modèle de surexpression de la protéine  $G_{\alpha q}$  avec le récepteur WT, alors que cette réduction de l'activité basale est absente ou gravement altérée pour le complexe 1WT + 3D63N. L'utilisation de ces modèles de récepteurs constitutivement actifs suggère que l'activité agoniste inverse ne sera pas nécessairement présente pour tous les modèles d'activation constitutive. De plus, les ligands possédant une activité agoniste inverse possèdent cette caractéristique à des niveaux variables.

Le WEB2086 figure parmi les molécules ayant une activité inverse élevée pour le récepteur du PAF. Cette molécule a déjà été utilisée comme traitement pour l'asthme et représente une avenue intéressante pour une potentielle thérapie anti-cancéreuse. Nos résultats suggèrent que le WEB2086 permet la diminution de l'expression de son récepteur, le PAFR. Le même phénomène est observé avec l'agoniste PAF. Ces deux ligands n'ont cependant pas toutes les mêmes caractéristiques pharmacologiques. Nous avons donc décidé d'étudier les différentes voies de signalisation et de circulation intracellulaires activées suite à une stimulation au PAF ou au WEB2086. Le PAFR, qui peut être désensibilisé par les PKC, est phosphorylé suite à une stimulation au PAF ou au WEB2086 par des PKC d'isoformes différentes. Il semble que les PKC  $\beta$ ,  $\theta$  et  $\zeta$  soit préférentiellement utilisées par le WEB2086, alors que les PKC  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$  sont stimulées lorsque les récepteurs sont en présence de PAF. Les mécanismes régissant la signalisation et la circulation intracellulaire du PAFR ne sont pas connus. Nos travaux tentent d'élucider ces mécanismes, en comparant les voies de signalisation induites par le PAF et le WEB2086. Le mécanisme de circulation intracellulaire permettant la



dégradation du PAFR utilise la voie des endosomes précoces et tardifs lors de la stimulation au PAF. Cependant, le mécanisme est différent suite à une stimulation au WEB2086. Les récepteurs sont ciblés à la dégradation indépendamment du type de ligand utilisé, soit un agoniste ou un agoniste inverse. L'utilisation d'inhibiteurs du protéasome et des lysosomes a permis d'établir que ces deux systèmes sont utilisés pour diminuer l'expression du récepteur du PAF.

La compréhension des mécanismes de la régulation négative du PAFR et de la signalisation induite par les agonistes inverses donneront des outils pour la mise en place de modèles généraux de la régulation du récepteur et faciliteront le développement de thérapies ciblant efficacement la signalisation du récepteur.

**MOTS CLÉS GÉNÉRAUX :** récepteur couplé aux protéines G (GPCR), récepteur du facteur activateur de plaquettes (PAFR), agonisme inverse, circulation intracellulaire (trafficking), désensibilisation à long terme (down-regulation).

## I - INTRODUCTION

*«Life is the continuous adjustment of internal relations to external relations.»*

*Herbert Spencer (1820-1903)*

Le but ultime de tout être vivant est d'exister suffisamment longtemps pour transmettre ses gènes et ainsi assurer la survie de son espèce. Ainsi, les anophèles consacrent leur vie entière (quelques heures) à la recherche d'un partenaire pour perpétuer leur espèce. Afin de préserver leur matériel génétique, les premières formes de vie cellulaire ont dû assurer le développement d'une barrière protectrice, délimitant les frontières de la cellule et permettant l'organisation et le maintien de leur environnement intracellulaire. La couche protectrice conservée à travers l'évolution se révèle de nature lipidique, limitant ainsi le passage des molécules hydrosolubles. Cependant, pour survivre, un échange constant avec l'environnement extérieur est nécessaire afin d'importer des nutriments et d'exporter les déchets. Ces échanges sont orchestrés par des protéines transmembranaires pouvant agir comme transporteur, pompe ou canal ionique. D'autres protéines peuvent catalyser des réactions biochimiques, organiser l'entité physique de la cellule en liant le cytosquelette et la matrice extracellulaire ou permettre la communication intercellulaire, via la détection de molécules spécifiques retrouvées dans l'environnement extracellulaire.

La communication intercellulaire s'est avérée un avantage évolutif certain. Chez diverses espèces vivant en colonies telles que les amibes *Dictyostelium*, la communication intercellulaire a permis la formation d'une structure organisée, le spore,

lors d'un appauvrissement en nutriments du milieu, permettant ainsi une diffusion en d'autres endroits potentiellement plus riches. Cette collaboration intercellulaire a pu permettre le développement d'êtres multicellulaires organisés, ayant une capacité de communication entre les divers intervenants cellulaires. Chez les eucaryotes «supérieurs», la communication et les échanges intercellulaires ont permis le développement de cellules spécialisées, contrôlant diverses fonctions vitales telles que la croissance, la reproduction et l'organisation tissulaire. Par la suite, cette communication entre l'environnement extérieur et les diverses cellules a permis le développement de systèmes plus complexes tels que les sens : l'ouïe, le goût, le toucher, la vision et l'odorat, et ultimement la conscience, suite à une intégration de tous ces renseignements.

Les contacts cellulaires avec l'environnement extérieur peuvent se produire de diverses façons. Les cellules peuvent communiquer directement entre elles par le partage de composantes de leur cytoplasme via les jonctions lacunaires (GAP) présentes à leur surface. Les diverses interactions avec la cellule peuvent également se produire via un récepteur et un ligand, relâché dans le milieu extracellulaire ou faisant partie intégrante d'une membrane cellulaire. La communication avec le monde extérieur, environnement ou individus, est la clé d'une bonne adaptation à son environnement. Le séquençage du génome humain a révélé que plus de 750 gènes servent à encoder la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCRs) (Chalmers et Behan, 2002; Venter et al., 2001). Les membres de cette famille de récepteurs sont impliqués dans la transmission de signaux de stimuli chimiques tels que les neurotransmetteurs, hormones, chimiokines, autacoïdes, ions, phéromones, odeurs et

stimuli lumineux (Ferguson, 2001). Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse portent sur le fonctionnement d'un GPCR, le récepteur humain du facteur activateur de plaquettes (hPAFR). Ce récepteur est impliqué dans de nombreux systèmes physiologiques tels que l'embryogénèse et les systèmes nerveux central, pulmonaire, circulatoire et immunitaire des mammifères.

### **Le facteur activateur de plaquettes**

Le facteur activateur de plaquettes (PAF; 1-O-alkyl-2-acétyl-sn-glycérophosphocholine) a été identifié (Benveniste et al., 1972) par un groupe de chercheurs étudiant un facteur relâché par des basophiles stimulés aux IgE et permettant l'agrégation plaquettaire. Une autre action de ce composé identifié à partir d'extraits rénaux permettait l'abaissement de la pression sanguine (Blank et al., 1979). La structure chimique du PAF a par la suite été déterminée par différents groupes (Benveniste et al., 1979; Blank et al., 1979; Demopoulos et al., 1979). L'action du PAF ne se limite cependant pas seulement à l'agrégation plaquettaire ou à l'abaissement de la pression sanguine : de nombreuses études ont démontré un rôle dans le système nerveux ainsi que dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques (Ishii et Shimizu, 2000; MacLennan et al., 1996; Prescott et al., 2000). Par son action proinflammatoire, le PAF peut causer la vasodilatation des vaisseaux, la contraction des muscles lisses, l'activation des neutrophiles, des éosinophiles et des macrophages. Il joue également un rôle important dans l'allergie, l'inflammation et le choc endotoxique (Braquet et Rola-Pleszczynski, 1987; Hanahan, 1986; Prescott et al., 1990; Snyder et al., 1989). La structure du PAF, au niveau de la position sn-1, est variable pour les chaînes alkyl. Le

groupe alkyl possédant 16 carbones (16 :0) possède la plus grande activité biologique; on trouve également la forme 18 :0 et moins fréquemment les formes 17 :0 et 18 :1 (Hanahan, 1986). La fonction de l'hétérogénéité des isoformes du PAF n'est pas encore connue.

Deux voies de synthèse du PAF sont connues, soit la voie de synthèse *de novo* et la voie du remodelage (Montrucchio et al., 2000) (Figure 1).

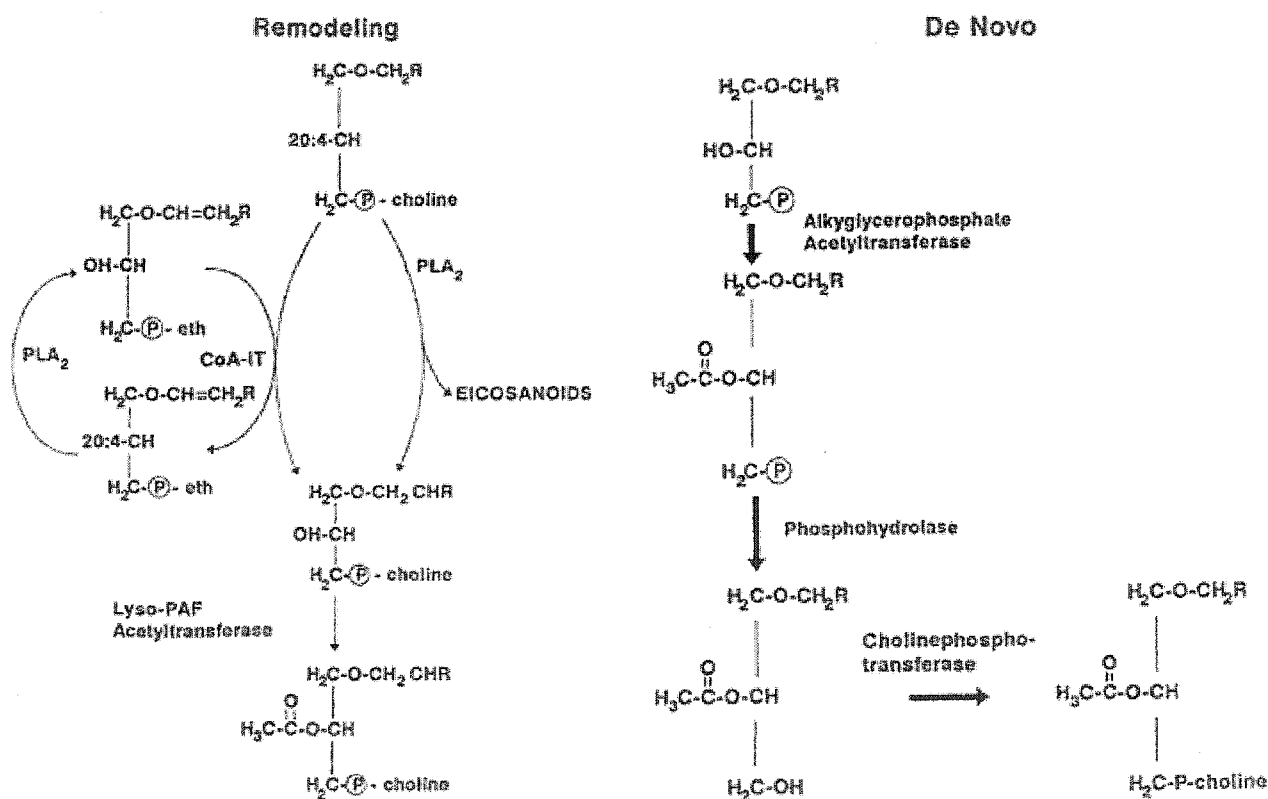


Figure 1. Schéma représentant les voies de synthèse du facteur activateur de plaquettes (Montrucchio et al., 2000).

La voie de synthèse *de novo* implique que le 1-0-alkyl-sn-glycéro-3-phosphate est acétylé par la 1-0-alkyl-sn-glycéro-3-phosphate :acétyl coenzyme A acétyl transférase. Ensuite, la 1-0-alkyl-sn-glycéro-3-phosphate phosphohydrolase entraîne la formation de 1-0-acyl-2-acétyl-sn-glycérol, celui-ci étant converti en PAF par l'action de la CDP-cholinephosphotransférase. Les enzymes impliquées dans cette voie de synthèse semblent agir de façon constitutive et sont régulées par la disponibilité du substrat (Blank et al., 1988). La voie de remodelage implique le remodelage des phospholipides membranaires et semble être la forme privilégiée de formation de PAF dans l'inflammation et la réponse allergique (Honda et al., 2002). La synthèse nécessite l'action d'une phospholipase spécifique (PLA<sub>2</sub>) puis d'une hydrolyse du 1-0-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine en acide arachidonique (AA) et en 1-0-alkyl-2-lyso-sn-glycéro-3-phosphocholine (lyso-PAF). Le lyso-PAF est acétylé par l'acétyl coenzyme A :lyso-PAF acétyltransférase pour former le PAF. L'acide arachidonique pourra servir à la formation d'autres médiateurs lipidiques tels que les leukotriènes, les prostaglandines et les thromboxanes. Le PAF synthétisé via les deux voies sera par la suite sécrété pour se retrouver dans les divers fluides physiologiques tel le plasma sanguin. Cependant, dans certains systèmes physiologiques, le PAF n'est pas sécrété et transloque à la surface externe de la membrane par un mécanisme de «flip-flop» encore mal défini. Le déclenchement d'une réponse n'est possible que par une interaction physique avec la cellule-cible, comme chez les cellules endothéliales activées exprimant la P-sélectine pour retenir les neutrophiles ciblés (Prescott et al., 2000; Zimmerman et al., 1996).

## Le récepteur du PAF

Le cDNA codant pour le récepteur humain du PAF a été cloné en 1991 par Nakamura et collaborateurs à partir de leucocytes (Nakamura et al., 1991). Lors de la transcription du gène du PAFR, deux ARN messagers sont obtenus. Le transcrit 1 est retrouvé dans les cellules leucocytaires et dans le cerveau, alors que les deux ARN messagers (transcrits 1 et 2) sont retrouvés dans le coeur, le poumon, la rate et le rein (Mutoh et al., 1993). Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs heptahéliques et sa signalisation s'effectue via les protéines  $G\alpha_q/11$  et  $G\alpha_i/o$  (Ishii et Shimizu, 2000; Izumi et al., 1995; Izumi et Shimizu, 1995; van Biesen et al., 1996). Une grande partie de la réponse au PAF provient de l'activation de phospholipases telles que les  $PLC\beta$  et  $\gamma$ ,  $PLA_2$  et  $PLD$  (Ali et al., 1997; Izumi et Shimizu, 1995). Ces enzymes transforment différents lipides comme le phosphatidylinositol membranaire pour former le diacylglycérol et les inositols phosphates qui vont participer à la redistribution du calcium intracellulaire et à l'activation des protéines kinase C. D'autres protéines kinases telle que la  $PI3K$  et certaines tyrosines kinases de la famille Jak, Fak, src, peuvent également participer à une réponse au PAF (Ali et al., 1997; Izumi et Shimizu, 1995; Soldi et al., 1996; van Biesen et al., 1996). Une signalisation par l'activation de la cascade des MAP kinases et de la voie Jak/STAT semble induite dans certains types cellulaires (Franklin et al., 1993; Franklin et al., 1995; Honda et al., 1994; Liu et al., 1994; Lukashova et al., 2001). La réponse au PAF *in vivo* démontre de nombreuses variations entre les différents individus, autant chez la souris que chez l'humain. Par exemple, lors d'un test de provocation bronchique induite au PAF en aérosol, une réponse bronchique et vasculaire est obtenue chez certains sujets sains alors que d'autres n'ont aucune réaction

(Rodriguez-Roisin et al., 1994). Récemment, un polymorphisme du récepteur du PAF a été décelé dans la population japonaise. Le polymorphisme est relativement fréquent (7,8%) et consiste en une substitution dans la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire de l'alanine 224 en aspartate. L'analyse *in vitro* démontre que cette variante du PAFR a une incapacité à mobiliser le calcium intracellulaire, à activer l'hydrolyse du phosphatidylinositol, à inhiber l'adenylate cyclase et diminue l'activité chimotactique en réponse au PAF, en comparaison avec un récepteur de type sauvage (Fukunaga et al., 2001).

### **Les ligands du récepteur du PAF**

L'activation dépendante d'une stimulation au PAF peut être inhibée par l'action de molécules structurellement analogues au PAF, ou par des molécules de structures complètement différentes (Figure 2) (Hwang, 1990; Negro Alvarez et al., 1997). Deux grandes classes peuvent regrouper les différents antagonistes du PAF, soit les analogues naturels du PAF et les composés synthétiques non-reliés au PAF. Premièrement, la famille des analogues naturels du PAF. Parmi ceux-ci est classifié le BN52021, un terpenoïde dérivé des feuilles de *Ginkgo biloba*. L'activité du BN52021 permet la réduction de la mortalité lors de septicémies causées par des bactéries gram-négatives (Dhainaut et al., 1994). Parmi les différentes activités observées pour les antagonistes synthétiques analogues du PAF, notons l'inhibition de la PAF-Acétylesterase et l'effet protecteur du CV-3988 contre les accidents pulmonaires (Inui, 1993). Pour les composés synthétiques non-reliés structurellement au PAF tel que l'Alprazolam ou le WEB2086, notons l'amélioration clinique de l'asthme suite à un traitement au WEB2086 (Negro Alvarez et al., 1997; Tamura et al., 1996). Cette molécule, aussi connu sous le nom



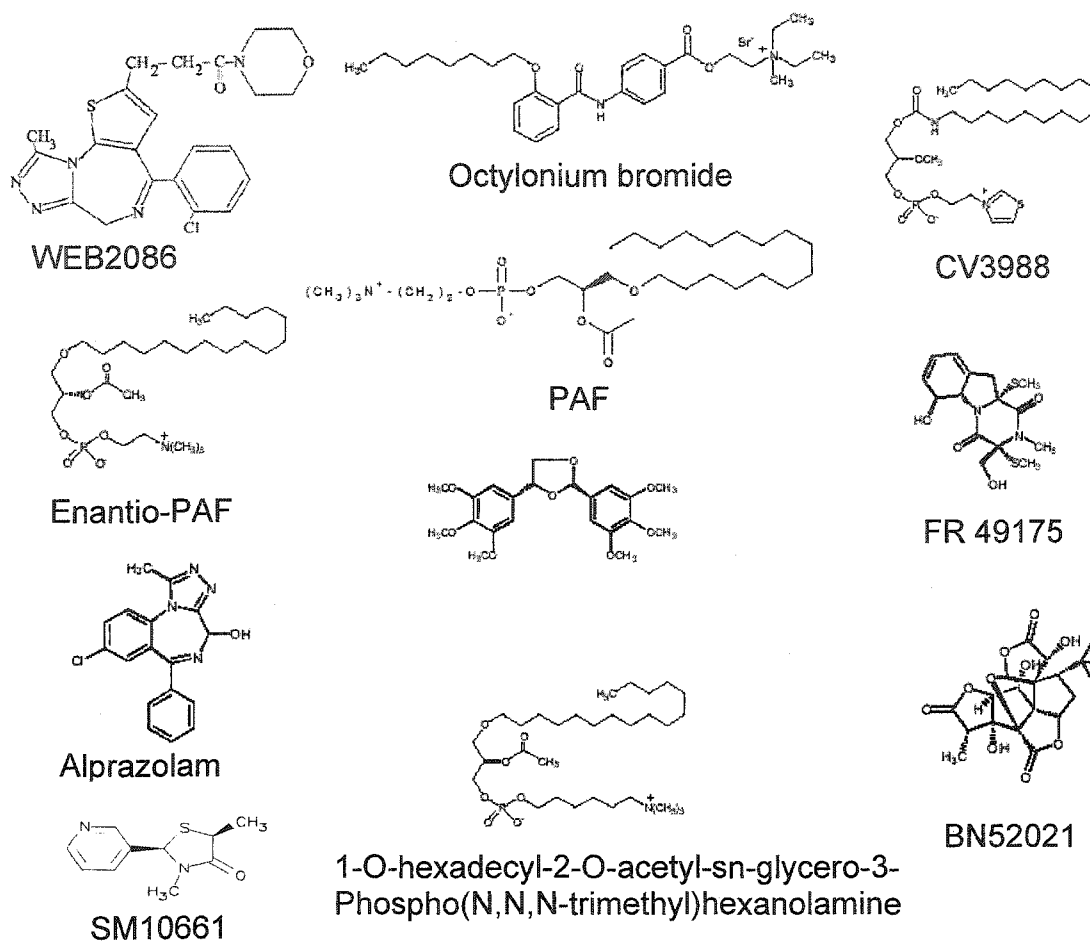


Figure 2. Représentations graphiques de la structure du PAF et de divers antagonistes

d'Apafant, est un des divers ligands capables d'interférer dans la signalisation du PAF, mais ne possède pas la capacité de traverser la membrane plasmique. Ce ligand fait partie de la famille des thienotriazolodiazépines, sa structure étant dérivée d'un anxiolytique ne présentant aucune ressemblance ni au PAF ni aux autres lipides (Casals-Stenzel et al., 1987). La spécificité du WEB2086 pour le récepteur du PAF est très élevée et son

affinité, indépendante de l'état de couplage du récepteur, en fait un outil intéressant pour la caractérisation du récepteur du PAF (Casals-Stenzel et al., 1987). De plus, le WEB2086 est incapable de lier le récepteur des benzodiazépines, contrairement à l'Alprazolam. Cette molécule, aussi connu sous le nom de Xanax, est un anxiolytique utilisé en clinique (Deltito et al., 1991). En plus de son efficacité à améliorer la condition de personnes asthmatiques, le WEB2086 peut également agir favorablement pour atténuer l'inflammation induite par des pneumonies à pneumocoques ou par la méningite. Il est également efficace dans le traitement de plusieurs types de dermatites (Cundell et al., 1995; Kemeny et al., 1996). Récemment, de nouvelles avenues thérapeutiques sont apparues puisque le WEB2086 est capable d'induire la différenciation terminale de cellules humaines leucémiques. Un traitement impliquant l'utilisation du WEB2086 pourrait permettre une thérapie pour la leucémie, en induisant la différenciation des cellules cancéreuses (Cellai et al., 2002).

### **La structure des récepteurs à sept domaines transmembranaires**

La prédiction de la structure des GPCRs a été établie par des études basées sur le résultat de digestions protéolytiques de certains récepteurs, sur les études d'hydrophobicité et par l'utilisation d'anticorps ciblant spécifiquement les régions intra- et extra-cellulaires du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (Dohlman et al., 1991; Hargrave et al., 1983; Savarese et Fraser, 1992). Récemment, la cristallisation du premier GPCR a été réalisée pour le récepteur à la rhodopsine (Palczewski et al., 2000). Jusqu'à cette réalisation, le modèle de prédiction de structure des GPCRs était basé sur les travaux de Baldwin et son modèle s'est avéré relativement juste (Baldwin et al., 1997; Sakmar,

2002). Les GPCRs montrent peu d'homologie de séquence dans leurs parties non-transmembranaires, c'est-à-dire dans les boucles intra- et extra-cellulaires, ainsi que les portions N- et C-terminales. Cependant, certaines portions sont hautement conservées parmi les différents récepteurs, démontrant ainsi une importance de ces régions conservées. Premièrement, les récepteurs à sept domaines transmembranaires sont des glycoprotéines, et comportent au moins une séquence consensus (N-X-S/T) permettant la glycosylation sur des résidus asparagine dans la portion extra-cellulaire du récepteur. Cette modification post-traductionnelle est importante pour l'expression membranaire des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique, neurokinine 1 et du PAF, sans toutefois affecter les propriétés de liaison et de réponse aux ligands. (Fong et al., 1992; Garcia Rodriguez et al., 1995; Rands et al., 1990). L'utilisation d'agents réducteurs a révélé l'existence de liaisons disulfures entre des cystéines. Malgré que les positions sur lesquels les liaisons disulfures se produisent varient entre les différents GPCRs, ces liens sont constamment observés et permettent une stabilisation de la structure tri-dimensionnelle et fonctionnelle des GPCRs (Lu et al., 1993; Savarese et Fraser, 1992). Un bon maintien de la conformation des récepteurs est nécessaire afin de constituer la cavité de liaison du ligand. En complément aux liens disulfures, des ponts hydrogène entre les divers domaines transmembranaires sont formés. Les résidus aspartate et asparagine sont importants dans la stabilisation des divers états d'activation des GPCRs. Lorsque mutées, diverses régions ont révélé des altérations dans les propriétés fonctionnelles chez plusieurs récepteurs à sept domaines transmembranaires. Les résidus de ces régions sont hautement conservés chez les GPCRs et se retrouvent principalement au niveau du 2<sup>e</sup> D(A/S)xAL(N/S) et 7<sup>e</sup> (N/S)(S/C)xx(N/D)PxxY domaines transmembranaires ainsi qu'à

la jonction du 3<sup>e</sup> domaine transmembranaire et de la 2<sup>e</sup> boucle intracellulaire (E/D/N)R(F/Y/S). Les études portant sur le 2<sup>e</sup> domaine transmembranaire ont révélé, pour les récepteurs 5-HT<sub>1A/2A</sub> et à la lutropine, une forte diminution de l'affinité pour l'agoniste (Chanda et al., 1993; Ji et Ji, 1991; Sealfon et al., 1995). La modification de l'aspartate en position 63 en asparagine (D63N) accroît l'affinité de 6 à 10 fois supérieure et une perte de couplage pour le récepteur du PAF (Parent et al., 1996b). Dans le 7<sup>e</sup> domaine transmembranaire, une asparagine ou un résidu similaire (aspartate) est conservée parmi 95% des GPCRs. Chez le récepteur du PAF, le changement de l'aspartate 289 en alanine permet une augmentation de l'affinité pour le PAF ainsi qu'une perte de couplage (Parent et al., 1996c). Finalement, la région comprenant le motif (E/D/N)R(F/Y/S), mieux connu sous le nom «DRY», constitue la région charnière lors de la transition entre les conformations inactives et actives (Alewijnse et al., 2000; Feng et Song, 2003; Rasmussen et al., 1999; Scheer et al., 1996; Scheer et al., 1997). Chez le récepteur du PAF, le motif se retrouve sous la forme NRF plutôt que DRY. Cependant, la caractérisation de cette région pour le récepteur du PAF n'a pas encore été réalisée.

### **Modèle d'activation des récepteurs**

Il est maintenant connu depuis quelques années que les GPCRs existent en équilibre entre les états de conformation actifs **R\*** et inactifs **R** (Kenakin, 1996; Leff, 1995; Lefkowitz et al., 1993). Ces différents modèles sont représentés dans la Figure 3. En *A*) Le modèle de formation des complexes ternaire étendu tel que présenté par Samama en 1993 (Samama et al., 1993). Le modèle suppose que les récepteurs existent dans un état inactive (**R<sub>i</sub>**) et actif (**R<sub>a</sub>**) ; les protéines G (entraînant une réponse physiologique) ne pouvant lier que la

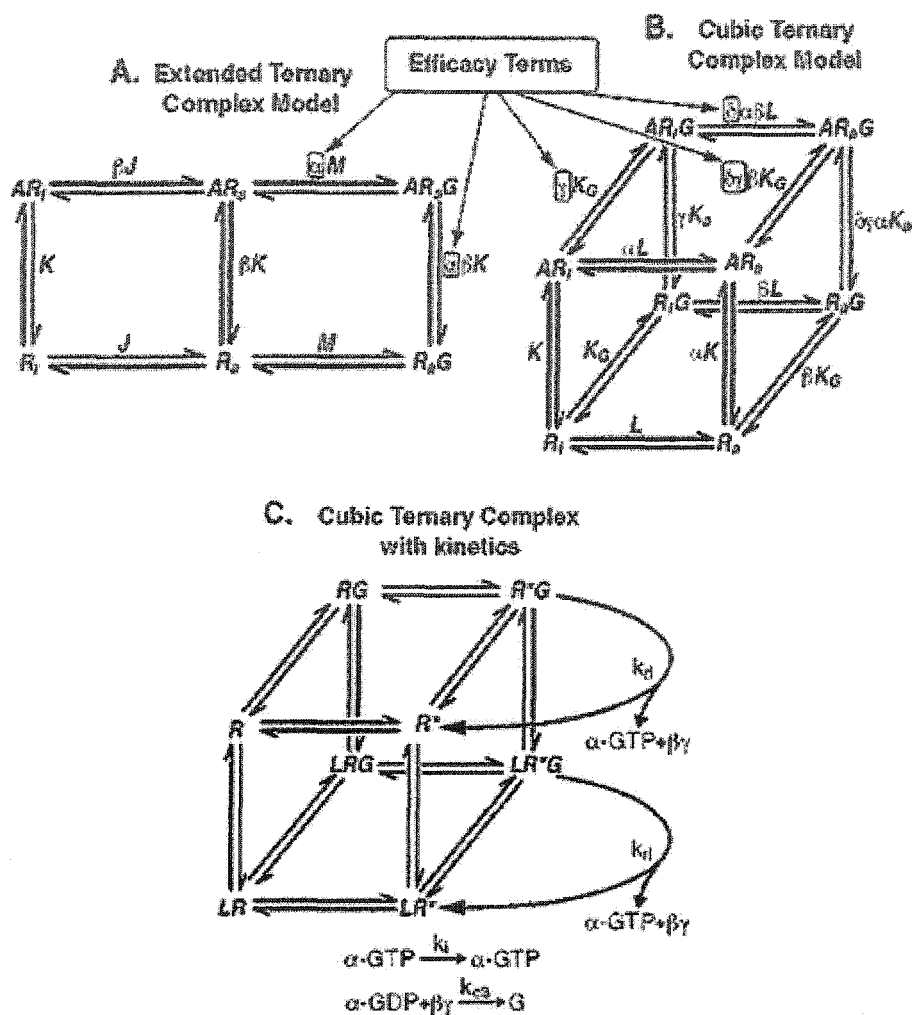


Figure 3. Représentation du modèle d'activation des récepteurs et des différents états conformationnels (Kenakin, 2002).

forme active ( $R_a$ ). L'addition d'un ligand A entraîne la formation de trois différents complexes ligand-récepteur, chacun étant capable de former un état actif permettant la liaison des protéines G. (B) Le modèle de complexe ternaire cubique permet d'être plus complet au niveau de la thermodynamique. L'état inactif du récepteur peut lui aussi former un complexe avec la protéine G, sans que celle-ci n'induisse une signalisation

(Weiss et al., 1996). (C) Le modèle de complexe ternaire cubique peut être complète par l'ajout d'une cinétique d'échange du GDP par du GTP et la subséquente activation des protéines G.

En conformation inactive **R**, les GPCRs sont découplés des protéines G alors qu'en conformation active **R\***, ils sont couplés et activent les protéines G. L'isomérisation des conformations **R** vers **R\*** peut se produire spontanément, c'est-à-dire même en absence d'un agoniste (Chidiac et al., 1994; Costa et al., 1992; Lefkowitz et al., 1993). Cette forme de récepteur constitutivement actif auquel une mutation donne une activité spontanée peut occasionner de graves problèmes. Par exemple, une mutation de l'aspartate 578 en glycine dans le 6<sup>e</sup> domaine transmembranaire du récepteur de l'hormone lutéinisante (LH) peut entraîner la maladie familiale de puberté précoce mâle (Shenker et al., 1993). Environ 13 autres mutations de ce récepteur peuvent causer le même phénotype. Cinquante mutations du récepteur à la thyrotropine causent une hyperthyroïdie alors que quatre mutations du récepteur à la rhodopsine causent divers types de cécité (Parnot et al., 2002). En plus de leur implication dans des maladies génétiques rares, les mutations somatiques rendant des récepteurs constitutivement actifs peuvent également être impliquées dans la croissance cellulaire et dans le développement de cancers. Certains GPCRs, dont l'oncogène *mas*, ont été identifiés grâce à leurs propriétés tumorigéniques (Young et al., 1986). Les premières constatations *in vitro* d'activité mitogénique et tumorigénique de GPCRs constitutivement actifs ont été faites avec le récepteur  $\alpha_{1B}$ -adrénergique (Allen et al., 1991). Deux observations récentes confirment un rôle des récepteurs constitutivement actifs dans le développement du

cancer : i) un GPCR encodé par un virus de type herpès associé avec le sarcome de Kaposi agit comme un oncogène viral et un activateur d'angiogénèse (Bais et al., 1998); ii) des mutations permettant l'activité constitutive du récepteur «Smoothened», chez le hérisson, sont observées lors de carcinomes sporadiques de cellules basales (Xie et al., 1998). L'utilisation ou le développement de récepteurs constitutivement actifs sont très pratiques pour l'étude de l'activité agoniste inverse de différents ligands, comme cela a été démontré pour les ligands du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (Samama et al., 1994).

### **Classification des ligands**

Pour les exemples précédents, un antagoniste neutre serait incapable de stabiliser préférentiellement un état ou un autre du récepteur. Certaines molécules, connues comme des agonistes inverses, permettraient cependant la diminution de la signalisation induite par l'activité de base élevée des récepteurs. Les agonistes inverses favorisent la stabilisation d'un état inactif, ce qui permet une diminution de la proportion des récepteurs en conformation active et une réduction du niveau basal d'activité de la signalisation (Chidiac et al., 1994; Samama et al., 1994; Shryock et al., 1998; Spadoni et al., 1998). Les ligands sont classés en trois grandes catégories : les agonistes, antagonistes et agonistes inverses. Lors d'une réponse spécifique, la liaison d'un agoniste au récepteur altère l'équilibre entre les conformations de récepteurs en favorisant l'état actif et en stabilisant cette conformation. Les antagonistes pourront diminuer une signalisation induite par l'agoniste, souvent en compétitionnant pour le site de liaison du récepteur. En absence d'agoniste, un antagoniste ne stabilisera aucune conformation préférentiellement, gardant le *statu quo* au point de vue conformationnel. Les agonistes

inverses ont une plus grande affinité pour l'état inactif plutôt que pour l'état actif. Ils provoquent une diminution de la proportion de récepteurs sous la conformation active et une réduction du niveau basal d'activation cellulaire. Cependant, il est important de noter qu'un agoniste, antagoniste ou un agoniste inverse est caractérisé pour une réponse spécifique. Pour une autre voie de signalisation, un agoniste inverse pourrait très bien agir comme agoniste et activer une voie de signalisation, alors qu'un agoniste n'induirait aucune signalisation (Baker et al., 2003). La classification des ligands est majoritairement faite par la caractérisation d'une seule voie de signalisation; souvent le dosage de la production d'inositols phosphates ou d'AMPc. Par le fait même, l'effet de ces ligands sur les autres voies de signalisation du récepteur reste indéterminé. De façon évidente, les agonistes inverses permettent le traitement de maladies causées par des mutations rendant les récepteurs constitutivement actifs. Par exemple, le sarcome de Kaposi pourrait être traité par des agonistes inverses dirigés contre le récepteur constitutivement actif KSHV (Rosenkilde et al., 1999; Rosenkilde et Schwartz, 2000). Des traitements contre des maladies induites par des récepteurs mutants constitutivement actifs liant diverses hormones telles que la PTH-PTHrP, TSH et LH peuvent être effectués par des agonistes inverses (Gardella et al., 1996).

### **Activité constitutive des récepteurs**

L'utilisation des récepteurs constitutivement actifs permet la détection de molécules permettant l'inhibition de l'activité indépendante du ligand. L'expression de récepteurs constitutivement actifs augmente l'activité basale des protéines G ainsi que des systèmes effecteurs, en comparaison avec un système où les GPCR seraient absents. Une



substitution de la leucine 231 par une arginine (L231R) dans la troisième boucle intracellulaire du PAFR permet la stabilisation du récepteur en forme active et provoque une augmentation du niveau basal de production d'inositols phosphates dans les cellules COS-7 (Parent et al., 1996a). La co-expression du récepteur de type sauvage avec le mutant découplé des protéines G D63N (substitution de l'aspartate 63 par une arginine) dans un ratio 1:3 a démontré que le niveau de base d'inositols phosphates produits est supérieur à celui du récepteur de type sauvage (WT) ou D63N seuls (Le Gouill et al., 1999). Le Gouill suggère que cette combinaison de récepteurs entraîne une activité de base constitutive pour la réponse en inositols phosphates puisque les récepteurs se retrouveraient en conformation active (Le Gouill et al., 1999). Cette combinaison de récepteurs serait également plus rigide, donc plus difficile à modifier son état d'activation (Le Gouill et al., 1999). La surexpression de protéines  $G_{\alpha q}$  avec un GPCR dans les cellules de mammifères permet également d'augmenter le niveau basal de la réponse, probablement en augmentant la probabilité qu'un récepteur non-couplé rencontre une protéine G. Ce type d'activité a été démontré préalablement avec les récepteurs muscarinique, à l'histamine H1 et à la sérotonine 5-HT<sub>2A</sub> (Bakker et al., 2001; Burstein et al., 1997; Weiner et al., 2001).

### **Activation des protéines G**

L'interaction ligand-récepteur s'effectue dans la cavité de liaison formée par l'arrangement cylindrique des domaines transmembranaires. Des interactions du ligand avec le récepteur peuvent également se produire avec la queue N-terminale ou avec d'autres régions extracellulaires (Braun et al., 1991). Une modification de la

conformation du récepteur peut s'effectuer et favorise le couplage à une protéine G. Les protéines G sont composées de 3 sous-unités distinctes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . La classification des protéines G est basée sur la nature de leur sous-unité  $\alpha$  (20 différentes) et consiste en 4 catégories :  $G_q$  ( $G_q$ ,  $G_{11}$ ,  $G_{14}$ ,  $G_{15}$ ,  $G_{16}$ ),  $G_i$  ( $G_{i1}$ ,  $G_h$  ( $G_{i2}$  bovine),  $G_{i2}$ ,  $G_{i2L}$ ,  $G_{i3}$ ,  $G_{0A}$ ,  $G_{0B}$ ,  $G_{gust}$ ,  $G_{t1}$ ,  $G_{t2}$ ,  $G_z$ ),  $G_s$  ( $G_{ss}$ ,  $G_{ls}$ ,  $G_{olf}$ ) et  $G_{12}$  ( $G_{12}$ ,  $G_{13}$ ) (Nurnberg et Ahnert-Hilger, 1996). Six sous-unités  $\beta$  et 12  $\gamma$  participent à la diversité de signalisation des GPCRs, par les différentes combinaisons utilisées entre elles ainsi qu'avec les sous-unités  $\alpha$  (Hamm, 1998). L'interaction d'une protéine G avec un GPCR permet un changement de la structure de la sous-unité  $\alpha$  qui favorisera l'échange du GDP lié par du GTP. Cet échange affecte l'affinité des sous-unités composant la protéine G et provoque leur dissociation fonctionnelle. Les sous-unités  $\alpha$  iront activer différents effecteurs comme des phosphodiésterases, des phospholipases ou des canaux ioniques (Hamm, 1998; Neer, 1995). Les sous-unités  $\beta\gamma$ , quant à elles, pourront activer différents effecteurs tels que des canaux ioniques, des adénylates cyclases, des phospholipases, certaines kinases et la voie des MAP kinases (Clapham et Neer, 1997). Les effets des différentes kinases activées peuvent être directs ou amplifiés par une cascade d'effecteurs et jouent un rôle majeur dans la signalisation des GPCRs.

### **La désensibilisation de la réponse des récepteurs**

Les études menées sur l'effet des protéines kinases A, C et G, ainsi que sur les kinases spécifiques aux récepteurs à sept domaines transmembranaires (GRKs) ont permis de démontrer leur effet dans le contrôle de la réponse cellulaire conduisant au phénomène de désensibilisation (Hausdorff et al., 1990; Mundell et al., 1997; Schwiebert

et al., 1992; Zhou et Fishman, 1991). En effet, suite à l'activation du récepteur, une désensibilisation de la réponse du récepteur permet de limiter dans le temps les effets de la stimulation (Bohm et al., 1997). Ce phénomène se produit dans les secondes suivant la stimulation d'un récepteur par un ligand, et permet le découplage fonctionnel de la protéine G du récepteur. Un des mécanismes utilisés pour le découplage fonctionnel est la phosphorylation de résidus sérine/thréonine de la 3<sup>e</sup> boucles intracellulaire ou de la queue cytoplasmique (Ferguson et al., 1996a; Haga et al., 1996). Deux types de désensibilisation peuvent se produire, soit la désensibilisation hétérologue ou homologue. Dans le cas de la désensibilisation hétérologue, les différentes kinases activées pourront phosphoryler des composantes de la signalisation comme les phospholipases et même des récepteurs n'ayant pas participé à la signalisation, afin de moduler une réponse potentielle à leur ligand (Ali et al., 1997; Schwertschlag et Whorton, 1988). Dans le cas de la désensibilisation homologue, les GRKs semblent principalement impliquées par leur rôle dans la reconnaissance de la forme de récepteur lié à un agoniste, malgré que les protéines kinases à second messagers puissent également jouer ce rôle (Dautzenberg et Hauger, 2001; Nagayama et al., 1996). Chez plusieurs récepteurs tels que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique, du PAF et de la rhodopsine, la phosphorylation induite par les GRKs favorise le recrutement de l'arrestine. Cette protéine est impliquée dans un autre phénomène important, l'internalisation des récepteurs (Ferguson, 2001; Miller et al., 2003; Santini et al., 2000).

## Endocytose des protéines membranaires

L'internalisation, aussi appelé séquestration des récepteurs permet un appauvrissement à la membrane du nombre de récepteurs ayant généré une réponse. L'internalisation permet de diminuer le nombre de récepteurs accessibles aux ligands extracellulaires étant donné la localisation vésiculaire des récepteurs internalisés (Ferguson et al., 1996b; Hertel et al., 1990). Ce phénomène peut permettre au récepteur de subir une resensibilisation, pour un retour à la surface cellulaire. Le ligand peut être dégradé lors de son entrée concomitante avec le récepteur par des vésicules riches en enzymes (Authier et al., 1996). Certains récepteurs subissent une déphosphorylation dans des vésicules riches en phosphatases 2A et 2B, avant d'être redirigés vers la membrane plasmique (Krueger et al., 1997; Pippig et al., 1995). Cependant, ce mécanisme général ne s'applique pas à tous les GPCRs. Par exemple, les récepteurs à l'endothéline (B) et récepteurs activés par les protéases (PARs), sont majoritairement ciblés à la dégradation par les lysosomes (Bremnes et al., 2000; Trejo et Coughlin, 1999). Dans le cas du récepteur à l'angiotensine ( $AT_{1A}R$ ), les récepteurs semblent retenus dans des compartiments endosomaux plutôt que ciblés à la dégradation lysosomale. En conséquence, ils ne sont donc pas recyclés à la membrane plasmique (Anborgh et al., 2000; Zhang et al., 1999). Il existe plusieurs mécanismes pour un récepteur afin de pénétrer à l'intérieur de la cellule. L'internalisation par les vésicules à clathrines est probablement la mieux connue et est certainement la plus étudiée (Damke et al., 1994; Goldenthal et al., 1984; Higgins et McMahon, 2002) (Figure 4).

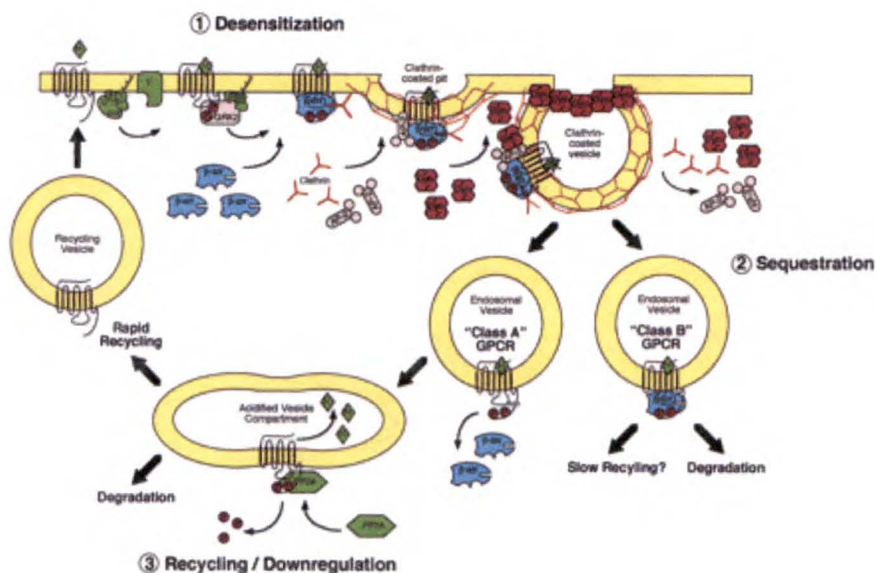


Figure 4. Représentation du modèle d'endocytose des récepteurs par les vésicules à clathrine (Luttrell et Lefkowitz, 2002).

La vésicule à clathrines est formée suite à une invagination de la membrane plasmique et recrute les récepteurs exprimés à la surface cellulaire. Après une série d'étapes bien régulées, l'invagination subit un pincement par l'effet de la dynamine et une vésicule est formée (Kirchhausen, 2000; Moore et al., 1987; Mukherjee et al., 1997; Pearse et al., 2000). Les protéines de la famille des arrestines peuvent servir d'adaptateurs entre différents récepteurs dont le  $\beta_2$ -adrénergique et le  $\mu$ -opioïde et les composantes des vésicules à clathrines (Goodman et al., 1996; Goodman et al., 1998; Zhang et al., 1998). De plus, la phosphorylation par les GRKs semble faciliter l'internalisation des récepteurs sans toutefois être nécessaire (Ferguson et al., 1995; Hausdorff et al., 1989). La majorité des récepteurs semble transiter par cette voie d'endocytose. Cependant, même avant le développement de protéines dominantes négatives interférant spécifiquement avec la formation des vésicules à clathrines, différents rapports sont venus appuyer l'hypothèse

que d'autres mécanismes puissent permettre l'endocytose de certains récepteurs tels que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique, de la cholecystokinine ainsi que de l'angiotensine  $AT_{1A}$  à l'intérieur d'une cellule (Benmerah et al., 2000; Chen et al., 1998; Raposo et al., 1989; Roettger et al., 1995; Zhang et al., 1996). Les différentes voies ne nécessitant pas les clathrines permettent l'entrée de larges particules ou de petites portions solubles en compagnie d'une portion de membrane. Ces mécanismes sont la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose médiée par les caveolae et l'internalisation constitutive indépendante des clathrines (Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001).

La phagocytose est principalement retrouvée chez les macrophages et autres phagocytes qui engouffrent de larges particules par l'extension de pseudopodes entourant la molécule à endocyter. L'internalisation est typiquement déclenchée par la liaison d'un ligand à un récepteur capable d'induire un stimulus phagocytaire. Il en résulte une exocytose localisée au site d'attachement de la particule et le pseudopode engouffre la particule dans un phagosome (Mellman, 2000; Mellman et Warren, 2000). La macropinocytose entraîne la formation de grosses vésicules irrégulières très dynamiques. Leur transit entre la membrane et le centre de la cellule persiste durant environ 5 à 20 minutes (Hewlett et al., 1994; Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001). La composition des macropinosomes ne semble cependant pas être différente de la membrane plasmique de laquelle ils sont dérivés. Il semble que ces structures soient riches en phosphoinositides spécifiques et en marqueurs de radeaux lipidiques (Hurley et Meyer, 2001; Manes et al., 1999). La régulation de ces vésicules se fait via la GTPase ARF6. La surexpression d'un mutant d'ARF6 en conformation n'accueillant que le GTP résulte en

une accumulation des macropinosomes à la surface cellulaire (Radhakrishna et Donaldson, 1997). Il semblerait que les effecteurs en aval d'ARF6 soient des composantes du cytosquelette, comme l'actine ou la Hssh3bp1 (human spectrin SH3-domain-binding protein 1) (Xu et al., 2000). Le recyclage de ces vésicules permettrait la reconstitution de l'hétérogénéité de la membrane plasmique.

L'endocytose via les caveolae entraîne la formation d'invaginations et celles-ci sont associées aux cavéolines. Ces protéines font partie de la famille des protéines liant le cholestérol et permettent la formation et le maintien de ces structures (Kurzchalia and Parton, 1999; Pelkmans and Helenius, 2002). Les caveolae sont des portions de membranes plasmiques invaginées présentes chez plusieurs types cellulaires et sont impliquées dans la transcytose et endocytose de composés sanguins, principalement chez les cellules endothéliales (Kurzchalia and Parton, 1999). La composition des caveolae ressemble beaucoup à celle des radeaux lipidiques. Ces régions sont enrichies en cholestérol, glycosphingolipides, protéines ancrées aux glycoposphatidylinositol (GPI) et plusieurs protéines membranaires (Brown and London, 1998; Simons and Ikonen, 1997). Plusieurs douzaines de récepteurs membranaires, molécules de signalisation et transporteurs membranaires sont localisés dans les caveolae. Les caveolae peuvent agir en tant que centrale de signalisation dans les cellules, en plus de leur rôle dans l'endocytose de molécules spécifiques (Ceresa and Schmid, 2000). Alors que les phénomènes d'endocytose précédents se produisent après stimulation, les cellules non-stimulées sont elles aussi capables de provoquer une endocytose de protéines membranaires de façon indépendante des clathrines (Lamaze et al., 2001; Nichols and

Lippincott-Schwartz, 2001; Puri et al., 2001). Par exemple, l'endocytose du récepteur à l'interleukine 2 était tout à fait normale malgré l'expression d'un mutant de la protéine Eps15, réputé pour bloquer la formation des vésicules à clathrines (Lamaze et al., 2001). Plutôt que de circuler vers les endosomes précoces tel qu'observé lors de l'endocytose des vésicules à clathrine, il semble que la voie constitutive d'endocytose indépendante des clathrines permette une accumulation des protéines à l'appareil de Golgi (Martin and Pagano, 1994; Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001). Cependant, l'endocytose par ce mécanisme semble beaucoup moins efficace puisque le taux d'endocytose est de  $0,5\% \text{ min}^{-1}$ , comparativement à  $10\% \text{ min}^{-1}$  pour l'endocytose dépendante des clathrines (Mukherjee et al., 1997). Un taux de  $0,5\% \text{ min}^{-1}$  permet un transit des protéines membranaires à l'appareil de Golgi chaque deux ou trois heures (Nichols et Lippincott-Schwartz, 2001). Malgré que différentes voies puissent être utilisées pour entraîner l'endocytose de récepteurs membranaires, certaines protéines nécessaires à l'endocytose semblent être partagées par plusieurs mécanismes. Par exemple, la dynamine est nécessaire à l'endocytose par les caveolae tout comme elle l'est pour l'endocytose par les vésicules à clathrines (Henley et al., 1998; Oh et al., 1998). Sinon, il semble qu'une autre GTPase, ARF6, puisse prendre la relève de la dynamine (Radhakrishna et Donaldson, 1997).

Alors qu'une partie des récepteurs internalisés échappe à la protéolyse en étant déphosphorylés, resensibilisés et recyclés à la membrane plasmique, une portion des récepteurs internalisés subit le même sort que le ligand et est dégradé. La diminution en nombre de récepteurs dans une cellule aide au phénomène d'adaptation cellulaire à une



stimulation répétée ou soutenue avec un agoniste (Hertel et al., 1985; Lohse, 1993). Ce phénomène permet une désensibilisation à long terme de la réponse et implique très souvent une baisse de synthèse de nouveaux récepteurs en plus de la dégradation des récepteurs existants et est connue sous le terme «down-regulation» ou régulation à la baisse du nombre de récepteurs (Figure 4) (Milligan, 1993).

### **Recyclage ou dégradation?**

Deux hypothèses sont suggérées afin d'expliquer le triage des molécules vers la dégradation ou le recyclage. La première, le tri post-endocytaire, suggère que suite à l'internalisation par une voie commune, les récepteurs suivraient une voie différente lors du recyclage vers la membrane plasmique ou du transit vers la protéolyse (Gagnon et al., 1998). Lors de la coexpression du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique et du récepteur  $\delta$ -opioïde dans les cellules HEK293, il a été montré que les deux récepteurs ont des cinétiques d'endocytose similaires, médiées par les vésicules à clathrines et impliquant le transport via les endosomes précoces. Cependant, leur cinétique de protéolyse est très différente; la demi-vie du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique est estimée à six heures alors que la protéolyse du récepteur  $\delta$ -opioïde est pratiquement complétée après deux heures d'exposition à l'agoniste. Des études récentes sur le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique ont montré qu'une mutation dans la portion distale de la queue cytoplasmique du récepteur entraîne un effet prononcé sur la circulation entre le recyclage et le lysosome sans toutefois causer d'effet détectable sur l'endocytose du récepteur (Cao et al., 1999). Ce mécanisme agit par un motif PDZ (PSD95/SAP90, DLG, ZO-1) qui interagit avec le «Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor» (NHERF) aussi connu comme EBP50 (ezrin-radixin-moesin binding

phosphoprotein 50) et lie ce complexe à l'actine du cytosquelette (Hall et al., 1998a; Hall et al., 1998b; Reczek et al., 1997). Le mécanisme d'endocytose des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique et  $\delta$ -opioïde se fait par les vésicules à clathrines, mais les voies utilisées diffèrent grandement lors du tri post-endocytique entre le recyclage et la dégradation. Une étude démontre qu'une séquence de 4 acides aminés (DSLL) du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique comprise dans le domaine d'interaction PDZ est un signal transplantable suffisant pour modifier les voies d'endocytose du récepteur  $\delta$ -opioïde en un recyclage rapide et ainsi inhiber la dégradation protéolytique des récepteurs. Il semble donc que ce soit la première description d'un signal permettant un recyclage rapide de certaines protéines membranaires et que le phénomène de recyclage ne soit pas induit via un flot des protéines en vrac mais plutôt par un tri sélectif lors de l'endocytose (Gage et al., 2001). Les opérations de tri décidant du destin des récepteurs se produiraient dans les endosomes précoces et feraient la sélection de la voie à prendre pour chaque récepteur soit vers les endosomes recyclants ou vers la dégradation lysosomiale (Roettger et al., 1995). La deuxième hypothèse, le tri pré-endocytique, suggère que la sélection des voies pour le recyclage et pour la dégradation protéique sont distinctes et établies avant l'internalisation du récepteur (Roettger et al., 1995). Par exemple, le récepteur de la cholecystokinine peut passer dans un même type cellulaire par deux mécanismes distincts pour son endocytose soit via les vésicules à clathrines ou par les caveolae. Il existe également des évidences que les mécanismes d'endocytose ciblent le récepteur de la cholecystokinine vers des voies distinctes (Roettger et al., 1995). De plus, la coexpression des récepteurs à la dopamine D1 et D2 démontre que ces récepteurs ne nécessitent pas les mêmes protéines pour leur endocytose et les récepteurs sont observés

dans des vésicules différentes immédiatement après l'internalisation dans le même type cellulaire. On observe cependant un taux de protéolyse similaire pour les deux récepteurs à la dopamine malgré la différence au niveau des processus d'endocytose (Vickery et von Zastrow, 1999). Il semble donc évident que plusieurs mécanismes d'endocytose peuvent se produire en même temps et dans les mêmes cellules, suggérant donc plusieurs mécanismes d'internalisation.

### **Les endosomes précoces et circulation intracellulaire : GTPases Rab et autres marqueurs des endosomes précoces**

Les protéines Rab sont de petites GTPases qui régulent le transport vésiculaire lors de l'endocytose et de l'exocytose. Plus de 60 de ces protéines ont été découvertes jusqu'à maintenant et chacune d'entre elles semble associée spécifiquement à un organite ou à une voie particulière (Zerial et McBride, 2001). Cependant, seulement une fraction des fonctions de ces protéines a été caractérisée. Par exemple, la protéine Rab4 est impliquée dans le recyclage endocytaire vers la membrane plasmique alors que Rab5 et Rab7 permettent l'internalisation des vésicules à clathrines jusqu'à la fusion avec les endosomes précoces et le transport des endosomes précoces aux tardifs (Bucci et al., 1992; Daro et al., 1996; Gorvel et al., 1991). Il semble donc que par des étapes séquentielles, les protéines Rab lient différents effecteurs et régulent de façon spatio-temporelle le transport vésiculaire (Christoforidis et al., 1999a; Christoforidis et al., 1999b). Chez les GPCRs, quelques études ont porté sur l'implication de ces différentes protéines dans l'endocytose et la circulation intracellulaire des récepteurs. Par exemple, l'utilisation de protéines dominantes négatives des GTPases Rab5 et Rab7 démontre que

le récepteur  $\kappa$ -opioïde humain utilise une voie permettant la dégradation des récepteurs qui soit dépendante de ces GTPases (Li et al., 2000). De plus, la surexpression de protéines dominantes négatives de Rab5 chez les cellules neuroendocriniennes PC12 exprimant le récepteur m4 muscarinique produit un effet sur la localisation membranaire du récepteur, réduit son internalisation et réduit la taille des vésicules d'endocytose comprenant ce récepteur (Volpicelli et al., 2001). L'expression de Rab5 constitutivement active favorise la localisation intracellulaire du récepteur m4 muscarinique et produit de larges vésicules dans lesquelles on retrouve le récepteur (Volpicelli et al., 2001). Il semble donc que les protéines Rab aient un rôle dans le contrôle de l'endocytose et de la circulation intracellulaire des GPCRs.

Cependant, les GTPases Rab ne sont pas les seules protéines impliquées dans le phénomène d'endocytose des récepteurs. Ces autres protéines peuvent également servir comme marqueurs de la circulation intracellulaire des récepteurs membranaires. À la suite du détachement de la vésicule de la membrane plasmique par la dynamine, la clathrine des vésicules est isolée et les vésicules sont fusionnées aux endosomes précoces. Les membranes des endosomes précoces contiennent des pompes à proton activées par l'ATP qui génèrent une diminution de pH. Elles contiennent aussi des protéines spécifiques comme EEAI (early endosome auto-antigen I), ayant comme fonction l'attachement des endosomes précoces aux autres vésicules (Bucci et al., 1992; Gorvel et al., 1991; Zerial et McBride, 2001). Au niveau des endosomes précoces, le pH se situe entre 5,5 et 6,0 contrairement à un pH de 7,2 pour le cytoplasme de la cellule. Le pH des endosomes permet la dissociation du complexe ligand-récepteur (Rosenfeld et al., 2002).

Rubino a démontré que des effecteurs de Rab5 tels que Rabaptin5, Rabex5, hVPS34 et EEAI étaient nécessaires lors de la fusion des membranes des endosomes avec celles des vésicules endocytiques (Rubino et al., 2000). EEAI est donc un excellent outil de localisation cellulaire, puisque cette protéine n'est exprimée qu'aux endosomes précoces.

### **Désensibilisation à long terme : régulation de l'expression membranaire et ciblage vers la dégradation**

Suite à une activation prolongée ou répétée des GPCRs, une désensibilisation à long terme permet une atténuation graduelle de la réponse cellulaire. Ce type de phénomène est très fréquent pour les cellules neuronales et son action semble cliniquement pertinente lors de la prise de médicaments neuropsychiatriques (Blanchard et al., 1983; Law et al., 1982; Roth et al., 1998). Il semble qu'une «down-regulation» ou désensibilisation à long terme puisse se produire par un changement conformationnel du récepteur, sans perte détectable de récepteurs (Wang et al., 1989). Cependant, dans la majorité des cas, la désensibilisation à long terme est associée à une perte nette de récepteurs membranaires. Les premières études sur le sujet ont démontré que pour contrer le phénomène de perte, une néosynthèse était nécessaire (Doss et al., 1981). L'internalisation des récepteurs amène également une perte de récepteurs à la membrane plasmique, mais favorise une redistribution des récepteurs vers une localisation intracellulaire plutôt qu'une perte nette de récepteurs exprimés. De nombreuses études portant sur la «down-regulation» ont démontré qu'un changement dans le taux de synthèse et de dégradation des récepteurs permet le contrôle du nombre de récepteurs exprimés dans les cellules. Par exemple, les niveaux d'ARN messager du récepteur  $\beta_2$ -

adrénergique sont modulés par une régulation transcriptionnelle du gène du récepteur ainsi qu'une modification de la stabilité de l'ARN messager du récepteur (Collins et al., 1989; Tholanikunnel et Malbon, 1997). Les études pharmacologiques sur le taux de renouvellement des récepteurs suggèrent fortement que les récepteurs subissent une dégradation régulée par la stimulation du récepteur, et que cette protéolyse est le mécanisme principal de désensibilisation à long terme des GPCRs (Heck et Bylund, 1998). Différents mécanismes sont suggérés pour la protéolyse des GPCRs. Des études de fractionnement sous-cellulaire, inhibition biochimique de la protéolyse lysosomiale et localisation immunocytochimique des récepteurs suggèrent fortement que la dégradation protéolytique de plusieurs GPCRs de mammifères est associée avec la translocation des récepteurs aux lysosomes (Ko et al., 1999). Une cascade d'événements permettent le transport des endosomes précoces vers les endosomes tardifs et les lysosomes (Zerial et McBride, 2001). Les endosomes tardifs sont enrichis en protéine Rab7 ainsi qu'en récepteurs mannose-6-phosphate, qui permettent respectivement une régulation du trafic vers les lysosomes et le transit des hydrolases du Golgi aux endosomes tardifs (Chavrier et al., 1990; Gorvel et al., 1991). Lors de la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes, le pH dans la vésicule nouvellement formée permet l'activation des protéases contenues dans les lysosomes (Rosenfeld et al., 2002). L'acidification des lysosomes jusqu'à un pH situé entre 5,5 et 6,0 est permise grâce aux pompes à ions  $H^+$  retrouvées à la surface de ces structures. Les enzymes lysosomales permettront par la suite la dégradation des récepteurs contenus dans les lysosomes.

## Mécanismes de dégradation des récepteurs

Les premiers résultats obtenus dans les études sur la protéolyse des GPCRs avec les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique et  $\delta$ -opioïde stimulés appuyaient déjà l'hypothèse que la dégradation était réalisée dans les lysosomes (Law et al., 1984). Depuis, de nombreux autres récepteurs tels que les récepteurs  $\kappa$ - et  $\delta$ -opioïde, le récepteur activé par les protéases (PAR-1) ainsi que le récepteur CXCR4 semblent dégradés aux lysosomes (Gagnon et al., 1998; Li et al., 2000; Marchese et Benovic, 2001; Moore et al., 1999; Tanowitz et Von Zastrow, 2002; Tsao et al., 2001; Wang et al., 2002). Cependant, de nombreuses évidences montrent l'existence de voies distinctes, ne nécessitant pas obligatoirement l'endocytose du récepteur ou la protéolyse lysosomiale. Un exemple démontrant ce fait est celui du récepteur V2 de la vasopressine. Les récepteurs stimulés de membranes isolées subissent un clivage endoprotéolytique de la portion N-terminale du domaine extracellulaire par une métalloprotéinase associée à la membrane plasmique (Kojro et Fahrenholz, 1995). Une étude plus récente démontre que le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique peut également subir une protéolyse indépendante du lysosome dans des cellules intactes mais par un mécanisme distinct de celui du récepteur V2 (Jockers et al., 1999). En principe, on pourrait croire que la dégradation non-lysosomiale provient d'une dégradation via le protéasome, un mécanisme utilisé par de nombreuses protéines cytosoliques, nucléaires et membranaires (Bochtler et al., 1999; Hicke, 1999). Cependant, le mécanisme indépendant des lysosomes pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique est résistant aux inhibiteurs du protéasome (Jockers et al., 1999). Le protéasome est capable de dégrader certains GPCRs comme les récepteurs  $\kappa$ - et  $\mu$ -opioïde après activation et endocytose des récepteurs à la membrane plasmique (Chaturvedi et al.,

2001; Li et al., 2000). Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique et  $\delta$ -opioïde peuvent également être dégradés par le protéasome, mais seulement après leur passage au réticulum endoplasmique. Le mécanisme sous-jacent ne serait pas dépendant de l'endocytose en provenance de la membrane plasmique (Petaja-Repo et al., 2001). Également, il semble que les récepteurs CXCR4 et CCR5 soient «down-régulés» de la surface cellulaire par un mécanisme dépendant du protéasome. Les auteurs rapportent également que le récepteur CCR5 peut directement interagir avec une sous-unité du protéasome, soit la sous-unité  $\zeta$  (Fernandis et al., 2002). De plus en plus d'études démontrent que l'ubiquitination pourrait jouer un rôle dans la dégradation protéolytique des récepteurs (Hicke, 1999; Strous et al., 1996). La poly-ubiquitination est un mécanisme bien connu de ciblage de protéines cytosoliques pour la dégradation au protéasome. Ces protéines sont marquées par l'attachement d'une queue de plusieurs protéines ubiquitines sur des résidus lysines, qui sert de signal de ciblage pour la dégradation. La modification d'une protéine avec une chaîne polypeptidique d'ubiquitine peut être programmé génétiquement ou acquise suite à une phosphorylation, un attachement à une protéine adaptatrice ou par des dommages dus à la fragmentation, l'oxydation ou le vieillissement cellulaire (Hershko et Ciechanover, 1998; Laney et Hochstrasser, 1999; Strous et Govers, 1999; Wilkinson, 2000). L'ubiquitination ne joue pas un rôle seulement dans le ciblage au protéasome. Un autre type d'ubiquitination, la mono-ubiquitination peut permettre le ciblage de protéines vers une dégradation lysosomiale comme observé dans le cas du récepteur CXCR4 (Marchese et Benovic, 2001). Il semble que le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique puisse également être dégradé par des mécanismes indépendants de l'endocytose dans certains



types cellulaires (A431 et cellules L) et par des mécanismes dépendants de l'endocytose impliquant le lysosome lorsque exprimé dans les cellules HEK293 (Jockers et al., 1999).

De façon intéressante, il n'y a pas que les agonistes qui puissent favoriser la régulation négative du nombre de récepteurs de la cellule. La clozapine est un anti-psychotique atypique faisant partie de la nouvelle génération de médicaments pour la schizophrénie. Il agit sur de nombreux neurorécepteurs dont le récepteur à la dopamine D2 et les récepteurs à la sérotonine (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>). Différentes études démontrent que la clozapine, et quelques autres antagonistes des récepteurs 5HT<sub>2A/2C</sub> peuvent réguler à la baisse le nombre des récepteurs 5-HT<sub>2A/2C/6</sub> à la membrane, alors que le nombre du 5-HT<sub>7</sub> est régulé à la hausse par la clozapine (Oekelen et al., 2001; Zhukovskaya et Neumaier, 2000). Ce n'est cependant pas le cas de tous les antagonistes ou agonistes inverses. Le deramciclane est un anxiolytique agissant comme agoniste inverse sur le récepteur à la sérotonine 5-HT<sub>2C</sub>, mais il est incapable de promouvoir la régulation négative de ce même récepteur (Palvimaki et al., 1998). On peut donc croire que différentes façons existent pour dégrader les récepteurs et que différents types de ligands peuvent induire cette régulation à la baisse des récepteurs.

### **Régulation de l'expression membranaire du récepteur du PAF**

Différents antagonistes ont été utilisés lors de plusieurs maladies fréquentes telles que l'asthme, les maladies vasculaires, diabète, septicémies et ont amélioré la condition des sujets étudiés (Peplow, 1999). Plusieurs antagonistes de structures différentes peuvent lier le récepteur du PAF et plusieurs d'entre eux ont un potentiel thérapeutique

intéressant. Puisque plusieurs phénotypes sont induits chez les souris transgéniques exprimant le récepteur du PAF, une augmentation de l'activité du PAFR est observée et pourrait constituer une cible intéressante pour les agonistes inverses. Jusqu'à maintenant, la majorité des ligands liant le récepteur du PAF n'étaient pas encore caractérisés pour leur activité agoniste inverse et étaient classifiés sommairement comme compétitionnant pour la liaison du PAF sur le récepteur, comme des antagonistes neutres. Le chapitre II présente une étude caractérisant diverses molécules connues comme étant capable d'antagoniser la liaison du PAF à son récepteur. Les chapitres III et IV présentent deux études qui tentent d'élucider les mécanismes de base de la régulation négative du récepteur du PAF, soit les voies d'endocytose et de circulation intracellulaire suite à une stimulation au PAF ou au WEB2086, le type de dégradation protéolytique utilisé ainsi que certains facteurs favorisant cette dégradation, comme la phosphorylation du récepteur. Les mécanismes menant au contrôle de l'expression du PAFR à la surface cellulaire ont été très peu étudiés jusqu'à maintenant. Il est connu que la régulation négative du récepteur du PAF se produit chez les lymphocytes B, dans les poumons après la naissance d'un rejeton et dans des explants artériels et que le contrôle de l'expression du récepteur du PAF soit nécessaire dans la réponse inflammatoire afin de contrebalancer la production locale du PAF (Chang et al., 2001; Ibe et al., 2000; Zhuang et al., 2000). Du point de vue mécanistique, plusieurs études ont démontré le rôle des protéines kinases C dans la régulation de l'expression du PAFR ou de la réponse au PAF (Chao et al., 1990; Shirasaki et al., 1994; Thivierge et al., 1996; Yue et al., 1992a; Yue et al., 1992b). Jusqu'à maintenant, différents éléments permettant la régulation du récepteur du PAF ont été étudiés mais aucune étude n'a tenté d'élucider la suite d'événements par lequel ce

contrôle est effectué. Les études présentées dans le cadre de cette thèse tentent d'effectuer un lien entre les différents mécanismes moléculaires et la physiologie du récepteur observés. Une meilleure compréhension des mécanismes de base de la régulation négative du PAFR et de la signalisation induite par les agonistes inverses donneront des outils pour la mise en place de modèles généraux de la régulation du récepteur et facilitera le développement de médicaments ciblant efficacement une étape particulière de la signalisation du récepteur ou ayant des structures permettant des effets plus spécifiques.

## CHAPITRE II – ARTICLE

**Inverse Agonist Activity of Selected Ligands of Platelet-Activating Factor Receptor.**

Dupré DJ, Le Gouill C, Rola-Pleszczynski M, Stankova J.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2001 Oct;299(1):358-65.

## CHAPITRE III – ARTICLE

**Trafficking, Ubiquitination and Down-Regulation of the Platelet-Activating Factor  
Receptor**

Dupré DJ, Chen Z, Le Gouill C, Thériault C, Parent JL, Rola-Pleszczynski M, and  
Stankova J.

*Journal of Biological Chemistry* (2003) 278, 48228-48235.

## CHAPITRE IV – ARTICLE

### **Inverse Agonist (WEB2086) Induced Signaling and Down-Regulation of the Platelet-Activating Factor Receptor**

Dupré DJ, Thompson C, Le Gouill C, Chen Z, Rola-Pleszczynski M, and Stankova J.

soumis au Journal of Biological Chemistry, Juin 2004

**Inverse Agonist-(WEB2086) Induced Signaling and Down-Regulation of the  
Platelet-Activating Factor Receptor**

Denis J. Dupré, Charles Thompson, Zhangguo Chen, Christian Le Gouill, Marek Rola-  
Pleszczynski and Jana Stankova<sup>§</sup>

Department of Pediatrics, Immunology Division, Faculty of Medicine, Université de  
Sherbrooke, Sherbrooke (Qc), J1H 5N4, Canada

Running title: Signal transduction by an inverse agonist of PAFR

**<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed:**

Jana Stankova, 3001 12<sup>th</sup> Avenue North, Immunology Division, Department of  
Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Qc), J1H 5N4,  
Canada. Tel.: (819) 564-5268, Fax: (819) 564-5215, email:  
[Jana.Stankova@USherbrooke.ca](mailto:Jana.Stankova@USherbrooke.ca)

*This work was supported by grants and a studentships (DJD, CT) from the Canadian  
Institutes for Health Research.*

## Summary

Platelet-activating factor (PAF) is a potent phospholipid mediator involved in several diseases such as allergic asthma, atherosclerosis and psoriasis. The human PAF receptor (PAFR) is a member of the G protein-coupled receptor family. Following stimulation, receptors become rapidly desensitized; this refractory state can be maintained for hours and is dependent on PAFR phosphorylation, internalization and down-regulation. In this report, we show that the inverse agonist, WEB2086, induced phosphorylation and down-regulation of PAFR. Using inhibitors, we determined that both the agonist, PAF, and WEB2086 could induce phosphorylation of PAFR by PKC. Using dominant negative (DN) mutants of PKC isoforms, we showed that DN PKC  $\epsilon$ ,  $\theta$  and  $\zeta$  inhibited WEB2086-stimulated PAFR phosphorylation, whereas PAF-stimulated phosphorylation was inhibited by DN PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$ . Further investigation demonstrated that WEB2086 induced PAFR down-regulation which could be blocked by PKC inhibitors and DN PKC $\beta$ . WEB2086-induced down-regulation was dynamin-dependent but arrestin-independent. Unlike PAF, WEB2086-stimulated intracellular trafficking of PAFR was independent of Rab5. Specific inhibitors of lysosomal proteases and of proteasomes were both effective in reducing the ligand-induced PAFR down-regulation, indicating the importance of receptor targeting to both lysosomes and proteasomes in long-term cell desensitization to WEB2086. These results indicate that although both agonists and inverse agonists induce receptor down-regulation, this may be accomplished through different signal transduction and trafficking pathways.



## Introduction

Platelet-activating factor (PAF)<sup>#</sup> is a potent phospholipid mediator released from activated basophils, platelets, macrophages, polymorphonuclear neutrophils and many other cell types (1). In humans, various diseases have been associated with PAF such as allergic asthma, endotoxic shock, acute pancreatitis, atherosclerosis and dermal inflammation including psoriasis and pruritis (2,3). PAF activity is mediated through the binding and activation of a specific, high-affinity PAF receptor (PAFR) on the target cell surface. The PAFR belongs to the family of G-protein coupled receptors (GPCR) and its signaling is linked to activation of various second messenger systems such as protein kinase C (PKC), phospholipases A<sub>2</sub>, C and D, mitogen-activated protein kinase cascades and the Jak/STAT pathway (4-13).

PAF-dependent cell activation can be inhibited by a variety of structurally distinct molecules such as Alprazolam, BN52021 (Ginkgolide B), WEB2086 and many others. WEB2086, a benzodiazepine, has been used in studies for treatment of asthma (14,15) and may also have some benefits in atherosclerosis and dermatitis (16,17). In a previous study, we demonstrated that WEB2086 and other antagonists can act as inverse agonists for PAFR (18).

The two-state equilibrium model of receptors can be used to illustrate the inverse agonist activity of certain ligands. Many GPCRs are spontaneously active, suggesting the presence of two conformational states, an equilibrium between active and inactive states in the absence of agonist (19-21). Agonist binding to the receptor alters the equilibrium,

favors the active state of the receptor and helps in stabilizing this conformation. In the absence of an agonist, antagonists do not preferentially stabilize either of the two conformations. Compounds displaying inverse agonism should have a higher affinity for the inactive state compared to the active conformation, resulting in a decrease in the proportion of receptors in an active conformation, and a reduction in the basal activation of effector mechanisms. Studies of the relationship between ligand structure and their properties may make it possible to predict secondary effects of some of these molecules in therapy and to develop new molecules with the desired characteristics, such as ligands which can induce short or long-term desensitization, without inducing undesired effector cascades.

The attenuation of GPCR signaling, after stimulation, is known as desensitization and involves several distinct mechanisms. Within seconds after agonist binding, GPCRs become functionally uncoupled from G proteins, and rapidly phosphorylated by different protein kinases such as G-protein coupled receptor kinases (GRK), PKC and PKA (22,23). Receptor phosphorylation and interaction with GRKs and arrestins can, in addition to G-protein uncoupling, promote internalization. Certain receptors then undergo endocytosis into endosomes and colocalize with the transferrin receptor and the ras-related Rab5 GTPase (24,25). After endocytosis, a receptor can be recycled to the cell surface or targeted for degradation. The down-regulation of the total number of receptors occurring after a prolonged treatment with an agonist (typically over periods of several hours) is thought to mediate long-term desensitization (26).

In the present study, we investigated the signal transduction pathways induced by WEB2086, a PAFR inverse agonist, and their role in PAFR physiology. The possibility of signaling by inverse agonists was previously suggested by antagonist-mediated signaling by 5HT receptors (27-32). In addition, a recent study, identified WEB2086 as a potent inducer of differentiation in murine erythroleukemia cells (MELC), erythroleukemia K562, HEL cells and promyelocytic leukemia HL60(33). Our results suggest that WEB2086 induced the activation of the PKC signaling pathway, as did the agonist PAF, however the isozymes activated by the two ligands were different. In addition, we had recently demonstrated that PAF-induced receptor endocytosis was necessary for PAFR down-regulation and that trafficking towards lysosomal degradation proceeded via the early and late endosomes, but that proteasomal degradation also occurred (24). Here we show that WEB2086 can also induce PAFR down-regulation, but through the activation of different signaling and trafficking pathways than PAF. Our results indicate that inverse agonists can not only prevent agonist-induced signaling, but also promote the activation of different signaling pathways.

## Experimental procedures

### *Materials*

Reagents were obtained from the following sources: WEB 2086 from Boehringer-Ingelheim (Ingelheim, Germany), RPMI 1640, DMEM high glucose and DMEM high glucose without L-Methionine and L-Cystine from Invitrogen Canada Inc. (Burlington, ON, Canada), bovine serum albumin, fetal bovine serum (FBS), GF109203X, chloroquine and protein A-Sepharose from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), FuGENE-6 Transfection reagent from Roche (Mississauga, ON, Canada), Redivue Pro-Mix  $^{35}\text{S}$ -methionine,  $^{32}\text{P}$ Phosphorus and Hyperfilm MP from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada), Proteasome inhibitor I (PSI) *clasto*-lactacystin  $\beta$ -lactone and (2S, 3S) trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester (EST) were from Calbiochem (San Diego, CA, USA).  $^3\text{H}$ -myo-inositol was obtained from Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA) and Dowex AG1-X8 columns from Bio-RAD Laboratories (Hercules, CA, USA). The anti-cMyc antibody clone 9E10 was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse antibody from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA). The rhodamine-conjugated goat anti-mouse antibody was obtained from Bio/CAN Scientific (Mississauga ON, Canada).

### *Cell culture, constructs and transfections*

COS-7 cells were grown in DMEM high glucose supplemented with 10% FBS and transfected using FuGENE-6. Cells were plated at a density of  $2.5 \times 10^6$  cells/dish in 100 mm dishes and transfected according to manufacturer's instructions, using 16  $\mu\text{l}$  of

FuGENE-6 and 8  $\mu$ g of DNA. Experiments were carried out 24 hours after transfection. Rab5 and Rab7 constructs were obtained as previously described (24) Dr. Gilles Dupuis and Dr. Jean-Guy Lehoux (Université de Sherbrooke) provided us the different constructs of constitutively active and dominant negative PKC.

#### *Inositol phosphate determination*

COS-7 cells were cotransfected with DNA encoding myc-epitope tagged (N-terminus) WT receptor as described previously (24). The following day, cells were labeled for 18-24h with 5  $\mu$ Ci/ml of  $^3$ H-myo-inositol in DMEM (high glucose, without inositol). After labeling, cells were pre-incubated with LiCl at a final concentration of 20 mM for 10 min at 37°C. Cells were then stimulated for 15 min and the reaction was terminated by the addition of perchloric acid. After an incubation of 30 min on ice, inositol phosphates were extracted and separated on Dowex AG1-X8 columns (Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA).  $^3$ H-labeled inositol phosphate levels were then evaluated by liquid scintillation.

#### *Metabolic labeling and immunoprecipitation of the PAF receptor*

Metabolic labeling and immunoprecipitation of the PAFR were done as previously described (24). Briefly, 24 hours post-transfection, cells were washed with PBS and incubated in DMEM high glucose without L-Methionine and L-Cystine for 30 min, at 37 °C. Then, 115  $\mu$ Ci of Redivue Pro-Mix  $^{35}$ S-methionine was added for 2 hours, at 37 °C. Medium was removed and cells were then incubated for 2 hours in DMEM high glucose with 10 % FBS. Pretreatments and stimulation with WEB2086 ( $10^{-5}$ M) were performed

for the indicated times. In the phosphorylation experiments, cells were washed with PBS and incubated in DMEM high glucose without sodium phosphate for 30 min, at 37 °C. Then, 80  $\mu$ Ci of  $^{32}$ Phosphorus was added for 2 hours, at 37 °C. Samples were lysed in 0.9 ml of RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 % IGEPAL, 0.1 % SDS, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ M/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor and 100  $\mu$ g/ml AEBSF). The lysate was solubilized by incubation at 4 °C for 30 min, precleared with 50  $\mu$ l of protein A-Sepharose beads at 4 °C for 1 h, and clarified by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min. The precleared lysate was incubated with an anti-c-Myc antibody for 30 min, then 50  $\mu$ l of protein A-Sepharose beads were added and the mixture was incubated for 1 h. After extensive washing with RIPA buffer, the immunoprecipitated proteins were eluted from beads with 50  $\mu$ l of SDS sample buffer, resolved by SDS-PAGE, and dried gels were exposed to Hyperfilm MP.

#### *Kinase Assay*

The kinase assays were performed using the kinase assay protocol described by Upstate (Lake Placid, NY, USA) with modifications. The reaction was performed for 15 min at 30°C in Upstate Reaction Buffer (200mM HEPES, pH, 7.4, 0.3% Triton-X 100.) in presence of 2.5 $\mu$ l of myelin basic protein (MBP), 2.5 $\mu$ l PKC Lipid Activator, 2.5 $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (1mM stock), 2.5 $\mu$ l sterile, distilled water, active PKC, 10 $\mu$ l of the diluted [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP mixture (1 $\mu$ Ci/ $\mu$ l with 90 $\mu$ l of the diluted Magnesium/ATP Cocktail (75mM MgCl<sub>2</sub> and 500 $\mu$ M ATP in 20mM MOPS, pH 7.2, 25mM  $\beta$ -glycerol phosphate, 5mM EGTA, 1mM sodium orthovanadate, 1mM dithiothreitol.)) An aliquot was transferred onto the center of a 2cm x 2cm P81 paper, washed three times for 5 minutes with 0.75%

phosphoric acid and once for 5 minutes with acetone. The assay squares were then transferred into vials with 5ml scintillation cocktail and scintillation was measured.

### *Cell Isolation*

Monocytes were obtained from peripheral blood of healthy medication-free volunteers, following informed consent in accordance with an Internal Review Board-approved protocol as described previously (34). Peripheral blood leukocytes were enriched by dextran sedimentation, layered over a Ficoll-Hypaque cushion, and centrifuged at 400 x g for 20 min. Mononuclear leukocytes were collected at the interface and washed twice with PBS and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin in a humidified atmosphere with 5% carbon dioxide at 37°C. Monocytes were then purified by adherence (60 min, 37°C) on plastic petri dishes coated with defibrinized autologous serum and removed with EDTA (0.01 M) in RPMI 1640–10% FBS. Cells were resuspended in RPMI 1640–10% FBS at  $1 \times 10^6$  cells/ml and allowed to rest overnight before stimulation with the appropriate stimuli.

### *Confocal Microscopy Analysis*

The cells were grown on coverslips (22 mm), transfected with constructs encoding for arrestin2-GFP or WT PAFR and 40 hours post-transfection, incubated with serum-free DMEM containing ligand, anti-cMyc antibodies and 0.1 % BSA at 4 °C for 30 min, then at 37 °C for indicated times. The coverslips were fixed with 3% paraformaldehyde for 20 min at room temperature (RT), then placed in 0.1% saponin in PBS for 20 min, and

sequentially incubated with 5% casein and 0.01 M glycine at RT for 20 min, each. The cells were then incubated with rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies for 1 hour. After washing, the coverslips were mounted on slides. The cells were analyzed on a Molecular Dynamics Multi-Probe 2001 confocal argon laser scanning system equipped with a Nikon Diaphot epifluorescence inverted microscope. Scanned images were transferred to a Silicon Graphics Indy 4000 workstation equipped with Molecular Dynamics Imagespace analysis software.

#### *Flow cytometry*

The evaluation of receptor cell-surface expression was done on monocytes isolated from healthy subjects. Cells were exposed to WEB2086 or PAF at 37°C for 30 min. Cells were then harvested, washed with PBS, and incubated at room temperature with or without anti-cMyc antibody. After 90 min, cells were washed with PBS and incubated for an additional hour with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse antibody. Receptor expression on the cell surface was then evaluated using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).



## Results

### *PKC-dependent signaling pathways*

In our studies on the signal transduction and desensitization of the PAFR, we noticed that while PAF induced the phosphorylation of PAFR, as expected, the antagonist WEB2086, now identified as an inverse agonist (18), also stimulated a certain level of PAFR phosphorylation when PAFR was expressed in COS-7 cells (Figure 1A). It had already been shown that PAFR could be phosphorylated by GRK, PKC and possibly PKA following PAF stimulation(22,23). Given the lack of GRK inhibitors we first investigated the possible role of PKC in PAFR phosphorylation by WEB2086. After a <sup>32</sup>-Phosphorus metabolic labeling, COS-7 cells were stimulated with PAF (10<sup>-6</sup>M) or WEB2086 (10<sup>-5</sup>M) and PAFR was immunoprecipitated. Figure 1A shows that the level of phosphorylation of PAFR in unstimulated cells is not changed with the PKC inhibitor, GF109203X (50nM), PAF-stimulated phosphorylation is partially reduced and WEB2086-stimulated phosphorylation is reduced by more than 80 ± 14%. These results indicate that a PKC enzyme is responsible for the majority of WEB2086-induced PAFR phosphorylation.

We then used dominant negative PKC constructs to study which isoforms may be involved in PAF- and WEB2086-induced phosphorylation of the receptor. Our results suggest a role for PKC β<sub>II</sub>, θ, ε and ζ isoforms for WEB2086-induced PAFR phosphorylation (Figure 1B, top panel), while PAF-induced phosphorylation of the receptor would preferentially use PKC α, δ, ε and ζ isoforms (Figure 1B, bottom panel). The expression of the DN constructs was assessed in COS-7 cells and all proteins were

expressed at similar levels (data not shown), except DN PKC  $\theta$ , which was expressed at lower levels, but was nevertheless effective in blocking WEB2086-induced phosphorylation.

Protein kinase C has been shown to mediate desensitization and down-regulation of PAFR (22,34,35). After coexpression of the PAFR and PKC constitutively active (CA) constructs, we labeled the cells with  $^3\text{H}$ -myo-inositol and the levels of inositol phosphate production were then measured as described in the experimental procedures. In order to obtain high basal levels of inositol phosphates so we could observe the inverse agonist effect of WEB2086,  $\text{G}\alpha_q$  was coexpressed with PAFR (Figure 2A) (18). Using the CA PKCs, Figure 2 shows that desensitization of the receptor can occur in the presence of WEB2086 (Figure 2A) or PAF (Figure 2B), via both common and distinct enzyme isoforms. The CA PKC  $\beta_{II}$  isoform can completely block the inverse agonist-induced effect of WEB2086 on inositol phosphate production, while other isoforms such as  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  were not as effective (Figure 2A). COS-7 cells expressing the CA PKC  $\delta$ ,  $\alpha$ , and  $\epsilon$  isoforms blocked PAF-induced inositol phosphate production while PKC  $\beta_{II}$  was less effective. These results suggest selective PKC isoform activation by the agonist (PAF) and the inverse agonist (WEB2086).

Several signaling pathways can lead to activation of PKCs. We were interested in determining the pathway leading to PKC  $\beta_{II}$  activation after a WEB2086 stimulation, given that WEB2086 does not activate IP production or  $\text{Ca}^{2+}$  influx. COS-7 cells transfected with PAFR cDNA were stimulated for 15 minutes with PAF or WEB2086, in

the presence or absence of PI3K inhibitors. After immunoprecipitation of PKC $\beta_{II}$ , we performed an in vitro kinase assay with myelin basic protein as substrate. Figure 3A shows that PKC $\beta_{II}$  was effectively activated by WEB2086 and not by PAF. In addition, inhibitors of the PI3K pathway, wortmannin and LY294002 greatly decreased WEB2086-induced PKC $\beta_{II}$  phosphorylation of the myelin basic protein (MBP). Furthermore, since previous data indicated PAF induced PKC $\delta$  activation, we proceeded to a kinase assay with immunoprecipitated PKC $\delta$ . Wortmannin pretreatment of cells did not affect PAF-induced PKC activation, as measured by the phosphorylation of MBP (Figure 3B) and no induction of PKC $\delta$  was observed following WEB2086 stimulation.

Our results indicate that PAFR can be desensitized by WEB2086 as well as PAF stimulation and previously, we demonstrated that the PAF receptor undergoes PAF-mediated down-regulation (24). We therefore investigated whether PAFR can undergo WEB2086-stimulated down-regulation using flow cytometry. Explain the switch in cell types. We studied the effects of long-term PAF and WEB2086 stimulation on monocyte PAFR expression and observed that a decrease of cell surface receptors occurred after a 5 hours stimulation with both PAF and WEB2086 (Figure 4A). Our results show a  $32 \pm 4$  % decrease of cell-surface receptors following WEB2086 stimulation while PAF promoted  $36 \pm 8$  % decrease in PAFR expression. To further characterize WEB2086-mediated receptor down-regulation, we used COS-7 cells transiently expressing the PAFR. 24h post-transfection, COS-7 cells were labeled with  $^{35}\text{S}$ -methionine for 2 hours, washed and then incubated in new medium for indicated times. PAFR was then immunoprecipitated, separated on SDS-PAGE and the autoradiograph was quantified

with densitometric analysis. Figure 4B and C, represent respectively the  $^{35}\text{S}$ -PAFR labeled representative autoradiogram and the mean of densitometric analysis of 3 independent experiments after a 15 hour stimulation with WEB2086 ( $10^{-5}\text{M}$ ). The degradation level obtained with WEB2086 was of  $45 \pm 4 \%$  while previous data demonstrated that methylcarbaryl-PAF a non-hydrolysable form of PAF could induce  $42 \pm 7 \%$  reduction in PAF-R content (24). A time course of receptor loss was performed to compare the kinetics of PAFR down-regulation induced by PAF and WEB2086 (Figure 4D). Basal, constitutive receptor degradation could be observed and reached a level of approximately 50 % of ligand-induced degradation. Approximately 30 % more receptors were degraded after 5 hours and a plateau (50% degradation) was reached after 8 hours of stimulation. The kinetics of down-regulation were similar in both PAF- and WEB2086-stimulated cells.

In order to determine whether WEB2086-induced PAFR down-regulation was a consequence of WEB2086-stimulated PKC activation, we treated PAFR-transfected COS-7 cells with a PKC inhibitor before WEB2086 stimulation, or cotransfected a DN PKC $\beta$ . Figure 4E shows that both GF109203X and DN PKC $\beta$  inhibit WEB2086-induced down-regulation of PAFR indicating that receptor down-regulation is a functional consequence for the inverse agonist-stimulated signaling pathway.

#### *WEB2086-induced trafficking of PAFR*

Since our studies indicated that WEB2086-induced down-regulation was of a similar magnitude and followed the same kinetics as PAF stimulation, we were interested in

determining whether PAFR followed the same pathways to degradation in cells stimulated by WEB2086 as in cells stimulated by PAF. Our previous studies showed that PAF-stimulated PAFR down-regulation was dependent on internalization and was dependent on arrestin recruitment and dynamin activity(24,36-38). In order to determine whether internalization was necessary for WEB2086-induced down-regulation, we co-expressed Dynamin 1A (K44A) dominant negative construct, known to inhibit the pinch off of clathrin vesicles with PAFR. 24h post-transfection, COS-7 cells were labeled with <sup>35</sup>S-methionine for 2 hours, washed and then incubated in new medium for 2 hours. PAFR was then immunoprecipitated and levels were quantified with densitometric analysis. Figure 5 shows that the dominant-negative mutant of dynamin inhibited PAFR degradation in cells stimulated for 5 hours with WEB2086.

We then investigated whether WEB2086 could induce the translocation of arrestins. We co-expressed arrestin 2-GFP with PAFR and stimulated the cells with WEB2086 or PAF for 30 min at 37°C. Cells were then incubated with anti-cMyc and rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies to reveal the PAFR. Our results show that PAF stimulation allowed recruitment of arrestin 2 (green) to the cell membrane and to colocalize with the PAFR (red), while no recruitment or colocalization occurred following WEB2086 stimulation (Figure 6).

WEB2086-induced trafficking of the receptor therefore appears to require internalization via a dynamin-dependent, but arrestin-independent mechanism. Trafficking of dynamin-dependent vesicles from the plasma membrane to early sorting endosomes, one of the

first steps in the endocytic pathway, is mediated by Rab5 (39). We examined the involvement of Rab5 in the trafficking of PAFR towards its degradation when stimulated by WEB2086. When the PAFR and WT Rab5 were co-expressed in the same cells,  $44 \pm 8$  % of total  $^{35}\text{S}$ -labeled PAFR were degraded after 5 hours (Figure 7). When the PAFR was co-expressed with a dominant negative form of Rab5, Rab5 S34N (40-42), the degradation was not prevented, in contrast to PAF-induced PAFR down-regulation(24). These results demonstrate the existence of different trafficking pathways toward PAFR degradation in PAF- and WEB2086-stimulated cells.

#### *Effect of lysosome and proteasome inhibitors on PAFR degradation*

Studies on GPCR down-regulation have demonstrated degradation of most of the receptors via two major mechanisms: lysosomal or proteasomal degradation. To further characterize the long-term desensitization of the PAF receptor, we examined the effects of the lysosomal enzyme inhibitor EST and proteasome inhibitor PSI on WEB2086-induced PAFR degradation. Pretreatment of PAFR expressing COS-7 cells with EST significantly ( $P \leq 0.01$ ) returned receptor expression to levels comparable to the ones in untreated cells (Figure 8). Chloroquine, another lysosomal inhibitor had a similar effect (data not shown). When WEB2086-stimulated cells had been pretreated with the proteasome inhibitor PSI, the level of degradation was diminished by approximately 72 % ( $P \leq 0.02$ ) and similar results were obtained with *clasto*-lactacystin  $\beta$  lactone, another proteasome inhibitor (data not shown).

## Discussion

In the present study, we have demonstrated that WEB2086, an inverse agonist, can induce activation of various signaling pathways. While studying PAF-activated signal transduction, we noticed that WEB2086 also induced phosphorylation of PAFR. Use of pharmacological inhibitors indicated that PKC was responsible for the majority of this phosphorylation, whereas PAF-activated phosphorylation was only partially inhibited by PKC inhibitors. The role of PKC in PAF-stimulated cells has been documented both at the level of specific effector mechanisms and desensitization pathways (34,35,43-45). Less is known of the PKC isozymes involved, however PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  have been shown to be activated by PAF (45,46). Our results confirm that PKC $\alpha$  and  $\delta$  are activated and indicate that  $\epsilon$  and  $\zeta$  isoforms may also play a role in PAF-stimulated signal transduction. In contrast, WEB2086 activates PKC $\beta_{II}$ , and  $\theta$ , in addition to the  $\epsilon$  and  $\zeta$  isoforms.

Diacylglycerol (DAG) is a requirement for conventional ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and novel ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) PKCs and conventional PKCs also require calcium, whereas atypical ( $\zeta$  and  $\iota/\lambda$ ) PKCs do not interact with DAG. Unlike PAF, WEB2086 stimulation does not induce inositol phosphate production or calcium influx (data not shown), therefore, WEB2086-mediated PKC activation must be triggered via an another mechanism. An alternate pathway may be via the activation of PI3K which in return, would activate PKCs (47). Our results showed that the inhibition of the PI3K pathway blocked WEB2086-induced, but not PAF-stimulated PKC activation, underlining the dichotomy of signaling between the two PAFR ligands. Interestingly, it has been shown that

different ligands may regulate different signaling cascades (48,49) although some may converge at the effector stage (49).

We then explored the potential role of WEB2086-induced signal transduction and we found that prolonged stimulation with WEB2086 resulted in reduced cell-surface receptor expression. We had previously shown that WEB2086, unlike PAF, WEB did not modulate the rate of internalization beyond the basal recycling of the receptor (18) and therefore we studied WEB2086-induced down-regulation of the PAFR. The chronic exposure to antagonists or inverse agonists usually provokes an adaptive change (up-regulation) in receptor density on the cell surface (50). Instead, exposure to the inverse agonist WEB2086 promoted down-regulation of PAF receptors. However receptor down-regulation was previously reported as a consequence of antagonist exposure at 5HT<sub>2a/2c</sub> receptors (51). Leysen and colleagues proposed that serotonin antagonists might cause alterations in the conformation, aggregation or chemical (e.g. phosphorylation) state of the receptor in such a way that the receptor loses its drug-binding properties rather than a change in receptor number *per se* (52). However, WEB2086 induced a net loss of PAF receptor protein from the cell.

We had already demonstrated that receptor endocytosis was arrestin- and dynamin-dependent and obligatory for PAFR down-regulation in PAF-stimulated cells (24,36). In addition, trafficking towards lysosomal degradation proceeded via early and late endosomes (Rab5- and Rab7-dependent) yet proteasomes were also involved in PAFR degradation (24). Our present results indicate that WEB2086-mediated PAFR down-



regulation, to a similar extent as agonist, although via different pathways than PAF.

WEB2086-mediated down-regulation was dependent on PKC $\beta$ , dynamin, but independent of arrestin2 and the Rab5-trafficking pathway.

Our results with the dynamin and Rab5 dominant negative proteins suggest an arrestin-independent endocytosis, as previously reported for other GPCRs such as the muscarinic receptors and the GABA(B) receptor (53-55). Other proteins, such as ARF6, might act as internalization chaperones and replace arrestin in WEB2086-induced endocytosis (56,57). Also, one mechanism for receptor internalization can directly target the IL-2R to the late endosome/lysosome (58). There is a possibility that a similar mechanism also functions for GPCRs, and might be implicated in WEB2086-induced trafficking of PAFR toward degradation.

Degradation of some GPCRs such as  $\beta_2$ AR, CXCR4 and  $\delta$ -opioid receptor during agonist-induced down-regulation occurs in lysosomes (59-63) but the degradation of the  $\beta_2$ AR, thrombin, opiate and  $\delta$ -opioid receptors can proceed through the proteasome (59-62,64,65). These observations indicate that both lysosomes and proteasomes may be involved in the degradation of GPCRs, as illustrated by the  $\beta_2$ AR,  $\kappa$ - and  $\delta$ -opioid receptor and PAFR which use both pathways (25,66,67). Our results confirmed that both mechanisms could also be used for WEB2086-induced down-regulation.

It is becoming increasingly clear that signaling via G protein coupled receptors is a diverse phenomenon involving receptor interaction with a variety of signaling partners.

Despite this diversity of signaling, ligands are commonly classified only according to their ability to modify G protein-dependent signaling. Both  $G_{\alpha s}$  and  $G_{\alpha i}$  have been shown to contribute to MAPK activation by the conventional agonist isoproterenol (68). Recently, it was shown that inverse agonists of the  $\beta_2$ AR and the V2 vasopressin receptors stimulate ERK1/2 activation in a  $G_{\alpha s}$ /i-protein-independent but arrestin-dependent manner (69,70). These results present a multi-state model of activation in which ligand-specific conformations are capable of differential activation of distinct signaling partners. Our results also show activation of distinct signaling pathways such as differential protein kinase activation, gene transcription activation, trafficking and regulation of cell-surface receptor expression by WEB2086 and PAF. Taken together, these results indicate that receptors can adopt ligand-specific conformations and consequently activate different signaling molecules with distinct downstream signaling pathways.

## References

1. Braquet, P., and Rola-Pleszczynski, M. (1987) *Prostaglandins* **34**, 143-148
2. Brocheriou, I., Stengel, D., Mattsson-Hulten, L., Stankova, J., Rola-Pleszczynski, M., Koskas, F., Wiklund, O., Le Charpentier, Y., and Ninio, E. (2000) *Circulation* **102**, 2569-2575
3. Ishii, S., and Shimizu, T. (2000) *Prog Lipid Res* **39**, 41-82
4. Prescott, S. M., McIntyre, T. M., and Zimmerman, G. A. (1990) *Thromb Haemost* **64**, 99-103
5. Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Sakanaka, C., Mutoh, H., Minami, M., Bito, H., Seyama, Y., Matsumoto, T., Noma, M., and et al. (1991) *J Biol Chem* **266**, 20400-20405
6. Ye, R. D., Prossnitz, E. R., Zou, A. H., and Cochrane, C. G. (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **180**, 105-111
7. Kunz, D., Gerard, N. P., and Gerard, C. (1992) *J Biol Chem* **267**, 9101-9106
8. Chase, P. B., Halonen, M., and Regan, J. W. (1993) *Am J Respir Cell Mol Biol* **8**, 240-244
9. Kuruvilla, A., Putcha, G., Poulos, E., and Shearer, W. T. (1993) *J Immunol* **151**, 637-648
10. Liu, B., Nakashima, S., Kanoh, H., Takano, T., Shimizu, T., and Nozawa, Y. (1994) *J Biochem (Tokyo)* **116**, 882-891
11. Honda, Z., Takano, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Ito, K., and Shimizu, T. (1994) *J Biol Chem* **269**, 2307-2315
12. Franklin, R. A., Tordai, A., Mazer, B., Terada, N., Lucas, J., and Gelfand, E. W. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 1111-1118
13. Lukashova, V., Asselin, C., Krolewski, J. J., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2001) *J Biol Chem* **276**, 24113-24121
14. Tamura, G., Takishima, T., Mue, S., Makino, S., Itoh, K., Miyamoto, T., Shida, T., and Nakajima, S. (1996) *Adv Exp Med Biol* **416**, 371-380
15. Spence, D. P., Johnston, S. L., Calverley, P. M., Dhillon, P., Higgins, C., Ramhamadany, E., Turner, S., Winning, A., Winter, J., and Holgate, S. T. (1994) *Am J Respir Crit Care Med* **149**, 1142-1148
16. Subbanagounder, G., Leitinger, N., Shih, P. T., Faull, K. F., and Berliner, J. A. (1999) *Circ Res* **85**, 311-318

17. Kemeny, L., Trach, V., and Dobozy, A. (1996) *Arch Dermatol Res* **288**, 492-494
18. Dupre, D. J., Le Gouill, C., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2001) *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 358-365
19. Milligan, G., Bond, R. A., and Lee, M. (1995) *Trends Pharmacol Sci* **16**, 10-13
20. Leff, P. (1995) *Trends Pharmacol Sci* **16**, 89-97
21. Leurs, R., Smit, M. J., Alewijnse, A. E., and Timmerman, H. (1998) *Trends Biochem Sci* **23**, 418-422
22. Ali, H., Richardson, R. M., Tomhave, E. D., DuBose, R. A., Haribabu, B., and Snyderman, R. (1994) *J Biol Chem* **269**, 24557-24563
23. Ishii, I., Saito, E., Izumi, T., Ui, M., and Shimizu, T. (1998) *J Biol Chem* **273**, 9878-9885
24. Dupre, D. J., Chen, Z., Le Gouill, C., Theriault, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 48228-48235
25. Moore, R. H., Tuffaha, A., Millman, E. E., Dai, W., Hall, H. S., Dickey, B. F., and Knoll, B. J. (1999) *J Cell Sci* **112 ( Pt 3)**, 329-338
26. von Zastrow, M. (2001) **7**, 265-271
27. Zhukovskaya, N. L., and Neumaier, J. F. (2000) *Neurosci Lett* **288**, 236-240
28. Toth, M., and Shenk, T. (1994) *Mol Pharmacol* **45**, 1095-1100
29. Newton, R. A., and Elliott, J. M. (1997) *J Neurochem* **69**, 1031-1038
30. Barker, E. L., and Sanders-Bush, E. (1993) *Mol Pharmacol* **44**, 725-730
31. Labrecque, J., Fargin, A., Bouvier, M., Chidiac, P., and Dennis, M. (1995) *Mol Pharmacol* **48**, 150-159
32. Rinaldi-Carmona, M., Prabonnaud, V., Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Casellas, P., Le Fur, G., and Herbert, J. M. (1994) *J Biol Chem* **269**, 396-401
33. Cellai, C., Laurenzana, A., Vannucchi, A. M., Della Malva, N., Bianchi, L., and Paoletti, F. (2002) *Faseb J* **16**, 733-735
34. Thivierge, M., Parent, J. L., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (1996) *J Immunol* **157**, 4681-4687

35. Ali, H., Fisher, I., Haribabu, B., Richardson, R. M., and Snyderman, R. (1997) *J Biol Chem* **272**, 11706-11709
36. Chen, Z., Dupre, D. J., Le Gouill, C., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2002) *J Biol Chem* **277**, 7356-7362
37. Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1997) *J Biol Chem* **272**, 21289-21295
38. Le Gouill, C., Parent, J. L., Caron, C. A., Gaudreau, R., Volkov, L., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1999) *J Biol Chem* **274**, 12548-12554
39. Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992) *Cell* **70**, 715-728
40. Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994) *Embo J* **13**, 1287-1296
41. Iwata, K., Ito, K., Fukuzaki, A., Inaki, K., and Haga, T. (1999) *Eur J Biochem* **263**, 596-602
42. Seachrist, J. L., Anborgh, P. H., and Ferguson, S. S. (2000) *J Biol Chem* **275**, 27221-27228
43. Perron, A., Chen, Z. G., Gingras, D., Dupre, D. J., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 27956-27965
44. Hu, H., Zhang, W., and Li, N. (2003) *J Thromb Haemost* **1**, 1805-1812
45. Takizawa, T., Kato, M., Suzuki, M., Tachibana, A., Motegi, Y., Fujiu, T., Kimura, H., Arakawa, H., Mochizuki, H., Tokuyama, K., and Morikawa, A. (2003) *Int Arch Allergy Immunol* **131 Suppl 1**, 15-19
46. Dearn, S., Rahman, M., Lewis, A., Ahmed, Z., Eggo, M. C., and Ahmed, A. (2000) *Mol Med* **6**, 37-49
47. Wymann, M. P., and Pirola, L. (1998) *Biochim Biophys Acta* **1436**, 127-150
48. Kurrasch-Orbaugh, D. M., Watts, V. J., Barker, E. L., and Nichols, D. E. (2003) *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 229-237
49. Martin, N. A., Ruckle, M. B., VanHoof, S. L., and Prather, P. L. (2002) *J Pharmacol Exp Ther* **301**, 661-671
50. Milligan, G., and Bond, R. A. (1997) *Trends Pharmacol Sci* **18**, 468-474

51. Van Oekelen, D., Luyten, W. H., and Leysen, J. E. (2003) *Life Sci* **72**, 2429-2449
52. Leysen, J. E., Van Gompel, P., Gommeren, W., Woestenborghs, R., and Janssen, P. A. (1986) *Psychopharmacology (Berl)* **88**, 434-444
53. Cinar, H., and Barnes, E. M., Jr. (2001) *Biochemistry* **40**, 14030-14036
54. Lee, K. B., Pals-Rylaarsdam, R., Benovic, J. L., and Hosey, M. M. (1998) *J Biol Chem* **273**, 12967-12972
55. Pals-Rylaarsdam, R., Gurevich, V. V., Lee, K. B., Ptasienski, J. A., Benovic, J. L., and Hosey, M. M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 23682-23689
56. Radhakrishna, H., and Donaldson, J. G. (1997) *J Cell Biol* **139**, 49-61
57. Naslavsky, N., Weigert, R., and Donaldson, J. G. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 417-431
58. Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001) *Mol Cell* **7**, 661-671
59. Law, P.-Y., Hom, D. S., and Low, H. H. (1984) *J Biol Chem* **259**, 4096-4104
60. Gagnon, A. W., Kallal, L., and Benovic, J. L. (1998) *J Biol Chem* **273**, 6976-6981
61. Kallal, L., Gagnon, A. W., Penn, R. B., and Benovic, J. L. (1998) *J Biol Chem* **273**, 322-328
62. Ko, J. L., Arvidsson, U., Williams, F. G., Law, P. Y., Elde, R., and Loh, H. H. (1999) *Brain Res Mol Brain Res* **69**, 171-185
63. Marchese, A., and Benovic, J. L. (2001) *J Biol Chem* **276**, 45509-45512
64. Hein, L., Ishii, K., Coughlin, S. R., and Kobilka, B. K. (1994) *J Biol Chem* **269**, 27719-27726
65. Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. (2001) *Science* **294**, 1307-1313
66. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P., and Bouvier, M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 4416-4423
67. Li, J. G., Benovic, J. L., and Liu-Chen, L. Y. (2000) *Mol Pharmacol* **58**, 795-801
68. Daaka, Y., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1997) *Nature* **390**, 88-91
69. Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Pineyro, G. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11406-11411
70. Baker, J. G., Hall, I. P., and Hill, S. J. (2003) *Mol Pharmacol* **64**, 1357-1369

**Abbreviations**

# 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), (2S, 3S) trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester (EST), G protein-coupled receptor (GPCR), myelin basic protein (MBP), human platelet-activating factor receptor (PAFR), Proteasome inhibitor I (PSI), transferrin (Tfn), wild-type (WT)

**Acknowledgments:** We are grateful to Dr. Gilles Dupuis and Dr. Jean-Guy Lehoux (Université de Sherbrooke) for the PKC constitutively active and dominant negative constructs, Dr. Jean-Luc Parent (Université de Sherbrooke) for Rab constructs and Denis Gingras for excellent technical assistance.

## Figure Legends

### *Figure 1 PKC-dependent signaling pathway*

COS-7 were transfected with PAFR cDNA (A) or PAFR and indicated PKC cDNA constructs (B). Twenty four hours post-transfection, cells were labeled with inorganic  $^{32}\text{P}$  for 2 hours, washed and then stimulated with WEB2086 for 15 minutes. A) Autoradiogram of the effect of a PKC inhibitor, GF109203X (50nM) on PAFR phosphorylation. Cells were treated with GF109203X for 30 min before stimulation with WEB2086 ( $10^{-5}\text{M}$ ). B) WT PAFR was co-expressed with dominant negative PKC isoforms before stimulation with WEB2086 ( $10^{-5}\text{M}$ ) or PAF ( $10^{-6}\text{M}$ ). Autoradiograms are representative of three independent experiments.

### *Figure 2 Effect of constitutively active PKC isoforms on PAFR inositol phosphate production in response to PAF or WEB2086*

COS-7 cells were transfected with PAFR cDNA and constructs of constitutively active PKC isoforms and 24 hours later were labeled with  $^3\text{H}$ -myo-inositol for a further 24 hours, then stimulated with WEB2086 (A) or PAF (B) for 15 min. In A, to induce high basal levels of inositol phosphate accumulation,  $\text{G}\alpha\text{q}$  protein was coexpressed with the PAFR and PKC constructs. Inositol phosphate accumulation was then measured as described in Experimental Procedures. Results are expressed as means  $\pm$  s.e. of three independent experiments.

### *Figure 3 Effects of PI3K inhibitors on PKC activation*

PAFR-expressing COS-7 cells were pretreated with PI3K inhibitors, stimulated with PAF



or WEB2086 and indicated PKC isozymes were immunoprecipitated. An in vitro phosphorylation assay was then performed with myelin basic protein as substrate.

A) Cells were pre-treated with wortmannin (15 nM) and LY294002 (5 $\mu$ M) and PKC $\beta_{II}$  activation following PAF (10<sup>-7</sup>M) or WEB2086 (10<sup>-5</sup>M) stimulation for 15 min was determined. B) Cells were pre-treated with wortmannin (15 nM) and PKC $\delta$  activation was determined following PAF (10<sup>-7</sup>M) or WEB2086 (10<sup>-5</sup>M) stimulation for 15 min. Results are expressed as means  $\pm$  s.e. of three independent experiments.

*Figure 4 WEB2086-induced down-regulation of the PAFR*

A) Human peripheral blood monocytes were stimulated for 5 hours with PAF or WEB2086. PAFR cell-surface expression was evaluated by flow cytometry. COS-7 cells were transfected with PAFR, 24 hours later labeled with <sup>35</sup>S-methionine for 5 hours, washed and then stimulated for (B, C) 15 hours or (D) the indicated times. Cells were stimulated for 15 hours to obtain the maximum levels of degradation and a representative autoradiogram (B) and the mean densitometric analysis of three independent experiments (C) are shown. (D) PAFR degradation was examined at indicated times in unstimulated, PAF-stimulated (10<sup>-7</sup>M) or WEB2086-stimulated (10<sup>-5</sup>M) cells. Results are expressed as mean densitometric analysis of three different experiments. (E) PAFR-transfected COS-7 cells were pre-treated with GF109203X (50nM) or cotransfected with DN PKC $\beta_{II}$ . Cells were labeled with <sup>35</sup>S-methionine for 5 hours, washed, and then stimulated with WEB2086 (10<sup>-5</sup>M) for a further 5 hours. Results are expressed as means  $\pm$  s.e. of three independent experiments.

*Figure 5 Dynamin-dependent down-regulation of PAFR*

COS-7 cells transfected with PAFR and WT dynamin (Dyn1A) or DN dynamin (DynK44A) cDNAs, 24 hours later were labeled with  $^{35}\text{S}$ -methionine for 5 hours, washed and then stimulated with WEB2086 ( $10^{-5}\text{M}$ ) for 5 hours. Results are expressed as means  $\pm$  s.e. of densitometric analysis of three independent experiments.

*Figure 6 Colocalization of arrestin2 and PAFR*

40 hours after transfection, cells were unstimulated or incubated in presence of PAF ( $10^{-7}\text{M}$ ) or WEB2086 ( $10^{-5}\text{M}$ ) for 30 minutes, then labeled with anti-cMyc antibodies, fixed with 3% paraformaldehyde before labeling with anti-EEA1 antibodies. Cells were then incubated with secondary antibodies for 1 h. Left panels show expression of PAFR receptor (Red); Centre panels show expression of arrestin2-GFP (green); Right panels are overlay images of arrestin2-GFP and PAFR.

*Figure 7 Rab5-independent trafficking of WEB2086-stimulated PAFR*

After 24h of co-expression of PAFR and Rab5 (WT or dominant negative Rab5 S34N), COS-7 cells were labeled with  $^{35}\text{S}$ -methionine for 5 hours, washed and then stimulated with WEB2086 ( $10^{-5}\text{M}$ ) for 5 hours. Results are expressed as means  $\pm$  s.e. of densitometric analysis of three independent experiments.

*Figure 8 Effect of lysosome and proteasome inhibitors on WEB2086-induced PAFR degradation*

After 24h of transfection in COS-7, cells were labeled with  $^{35}\text{S}$ -methionine for 5 hours,

washed, treated with inhibitors (EST, PSI) for 30 min and then stimulated with WEB2086 ( $10^{-5}$ M) for 5 hours in presence of the inhibitors. Results are expressed as means  $\pm$  s.e. densitometric analysis of three independent experiments.

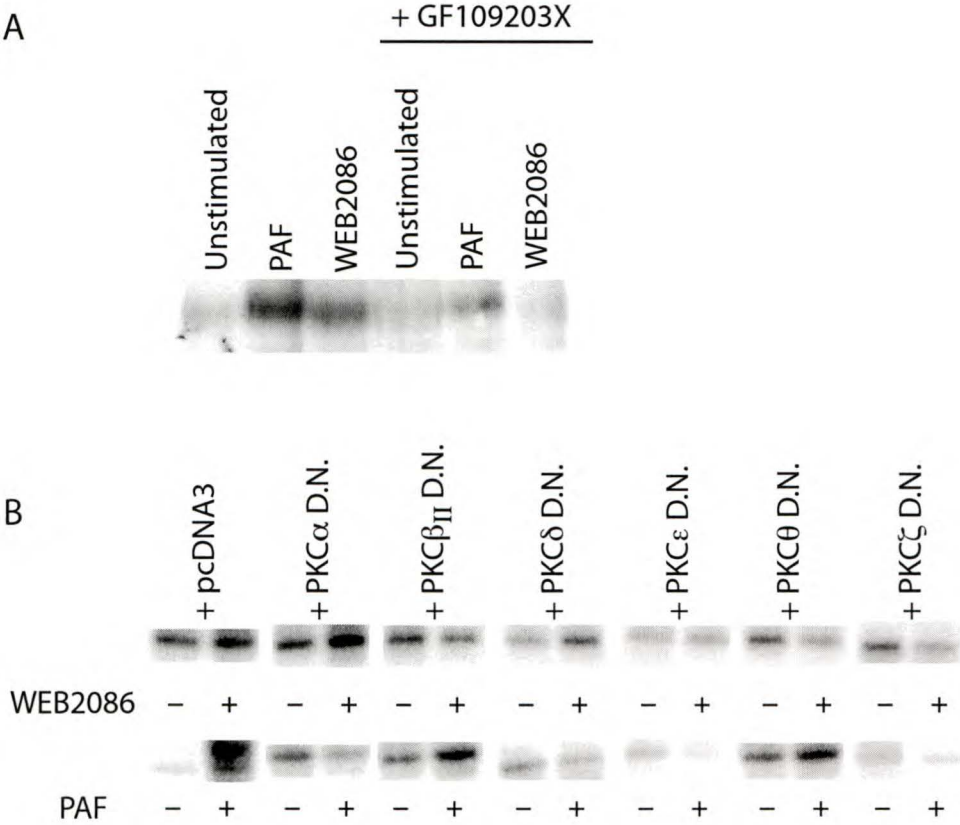


Figure 1

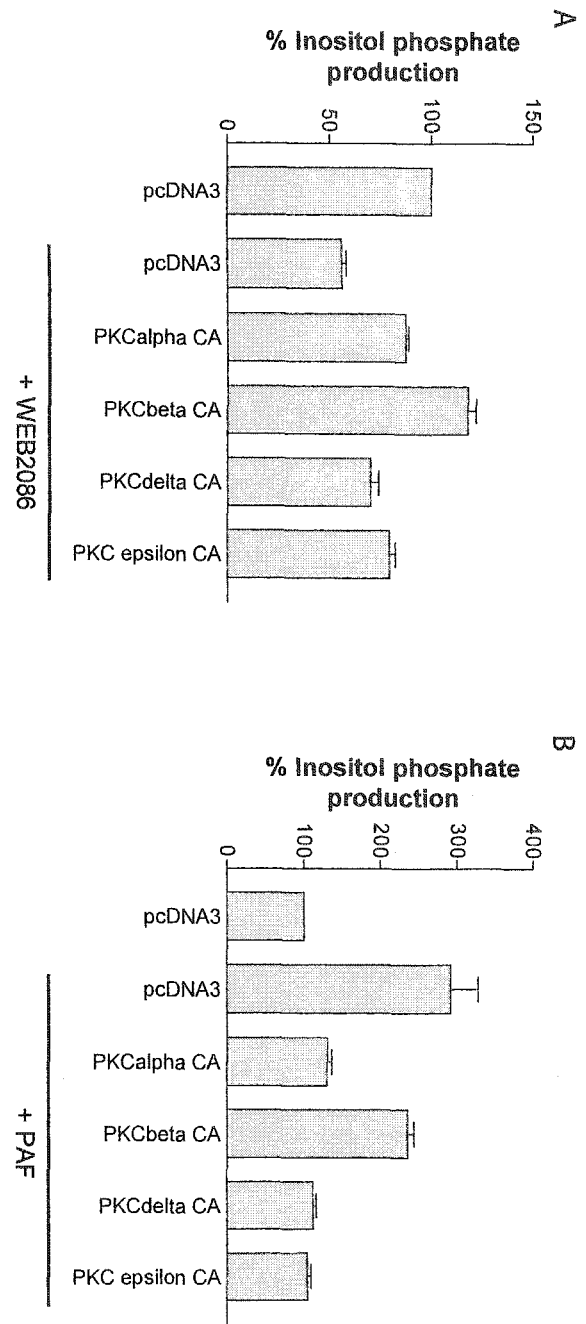


Figure 2

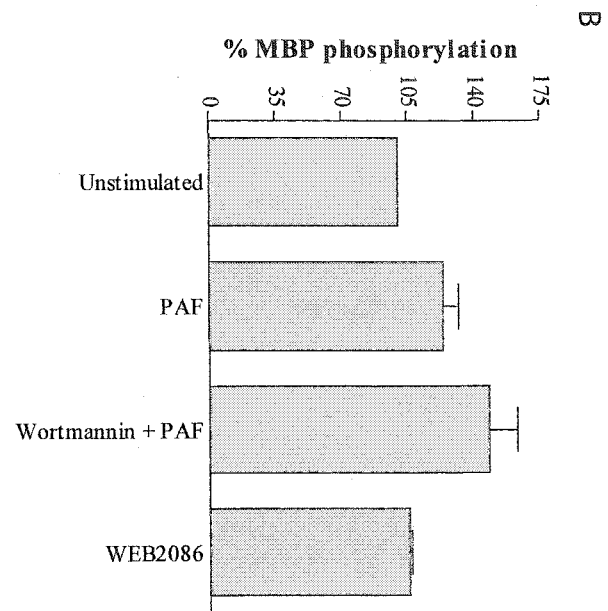
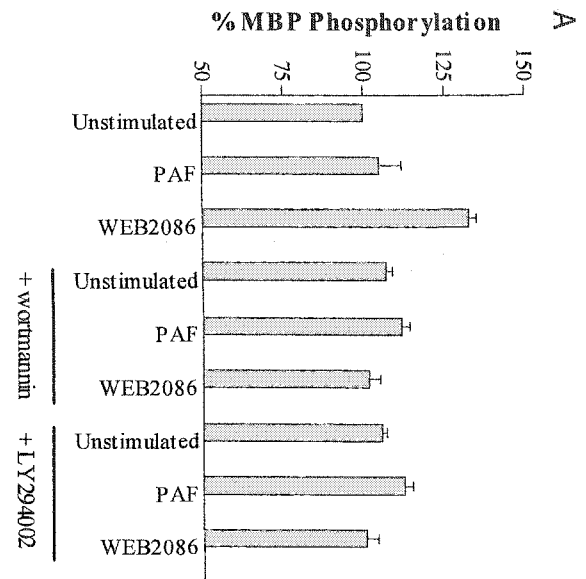


Figure 3

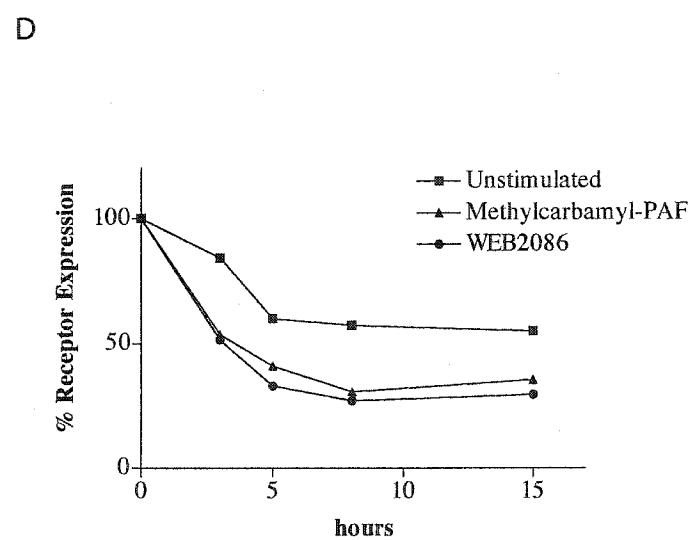
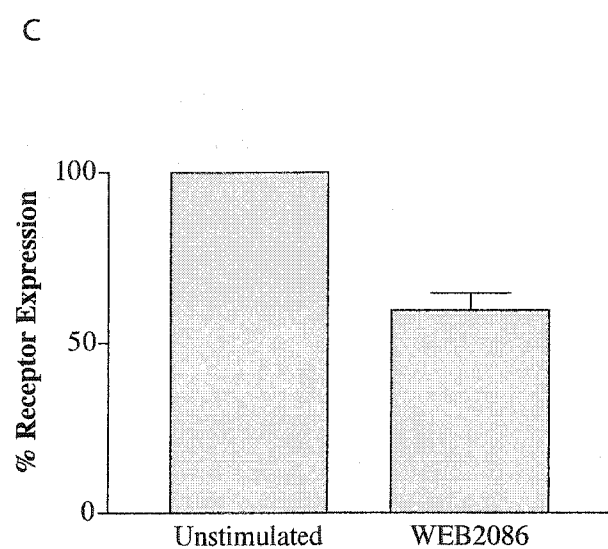
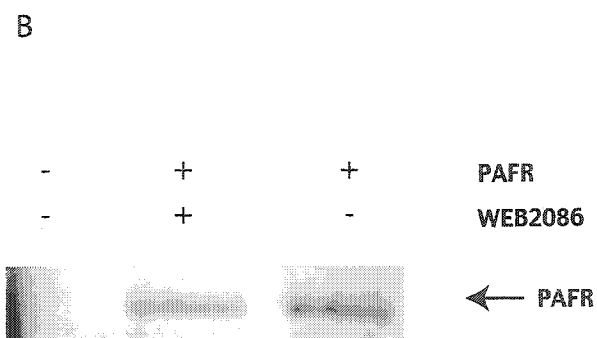
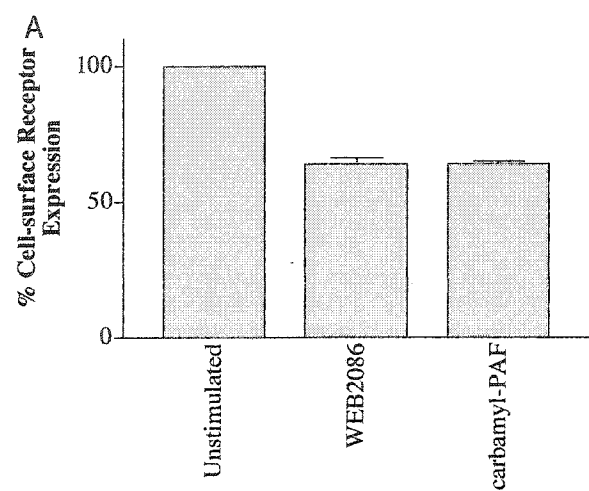


Figure 4

E

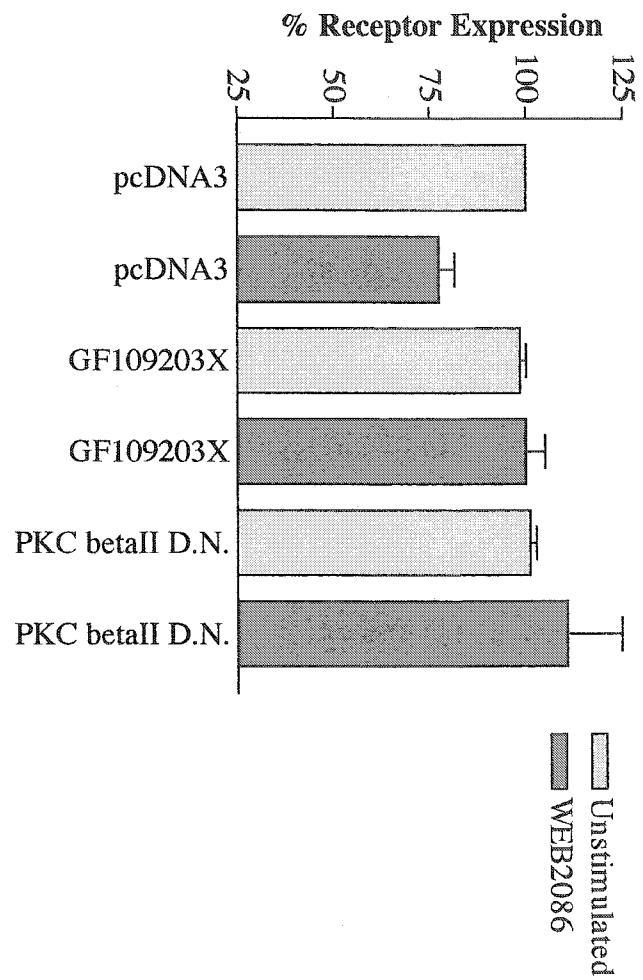


Figure 4



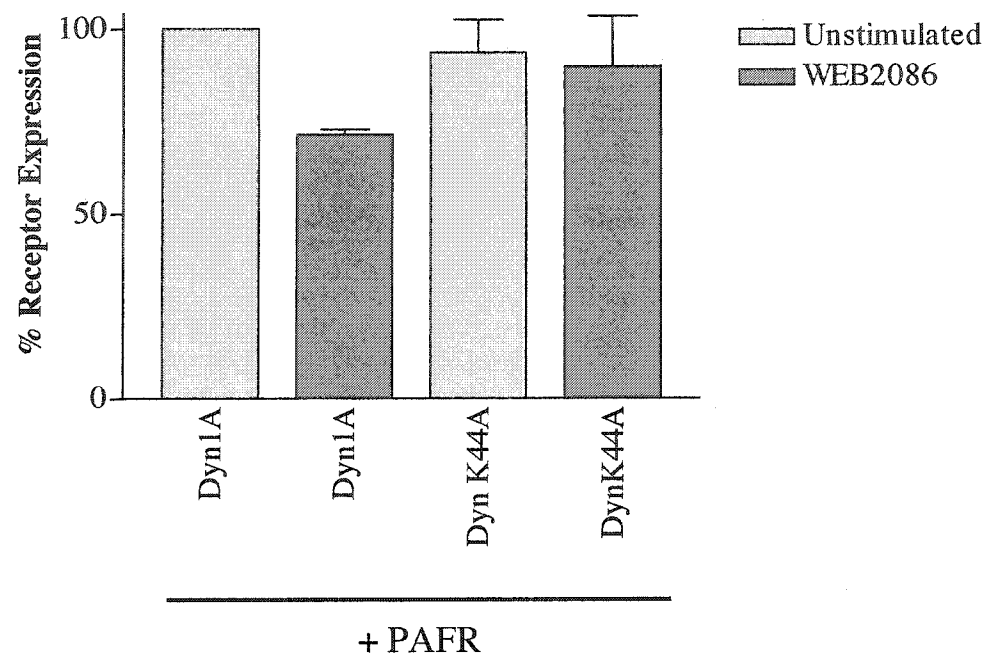


Figure 5

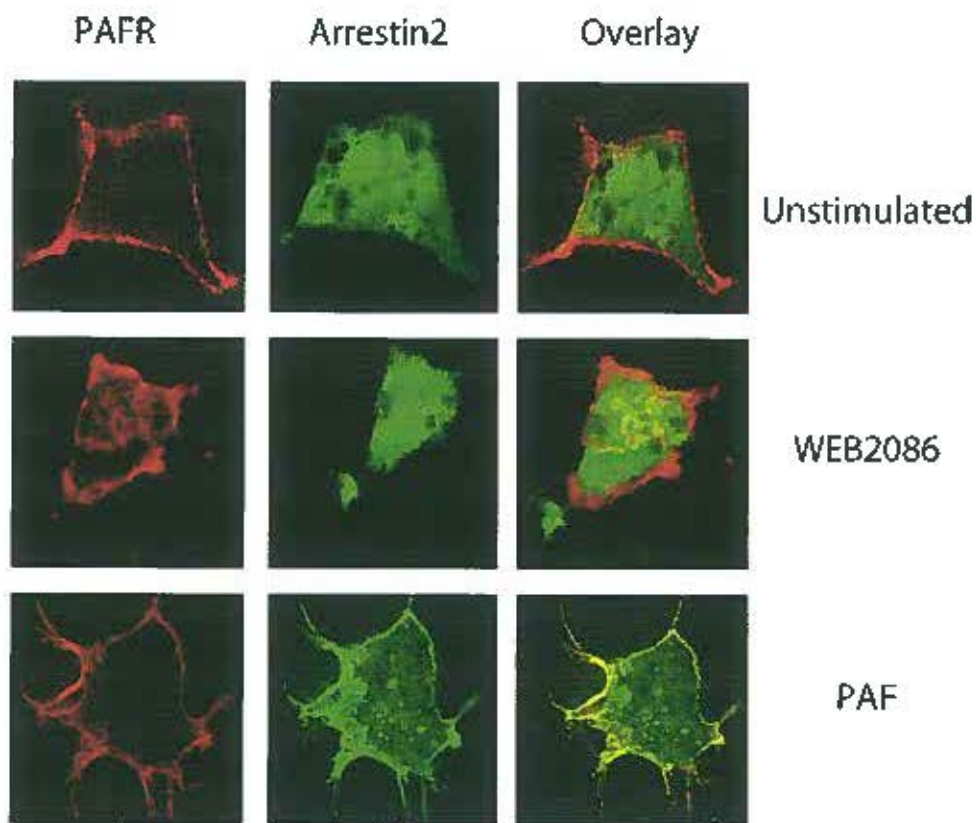


Figure 6

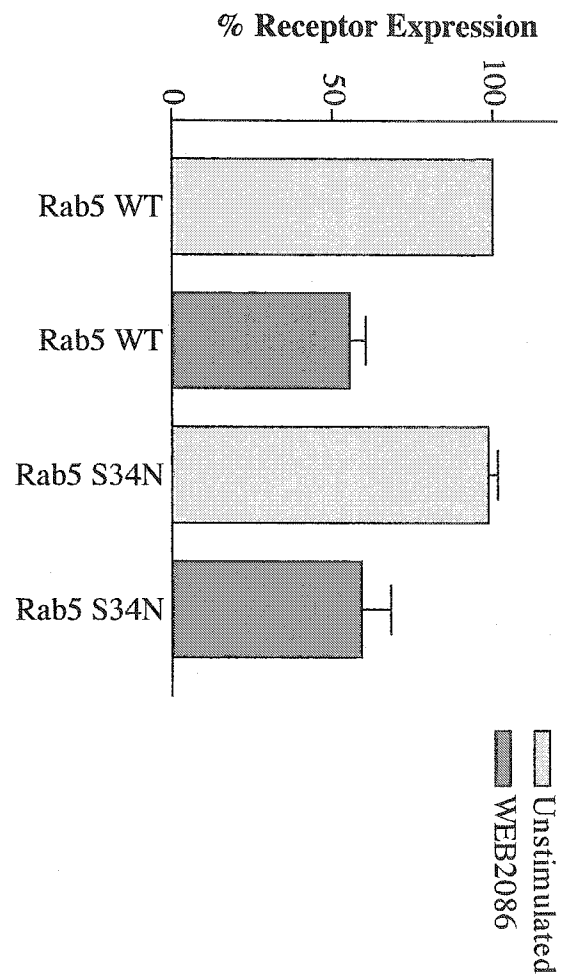


Figure 7

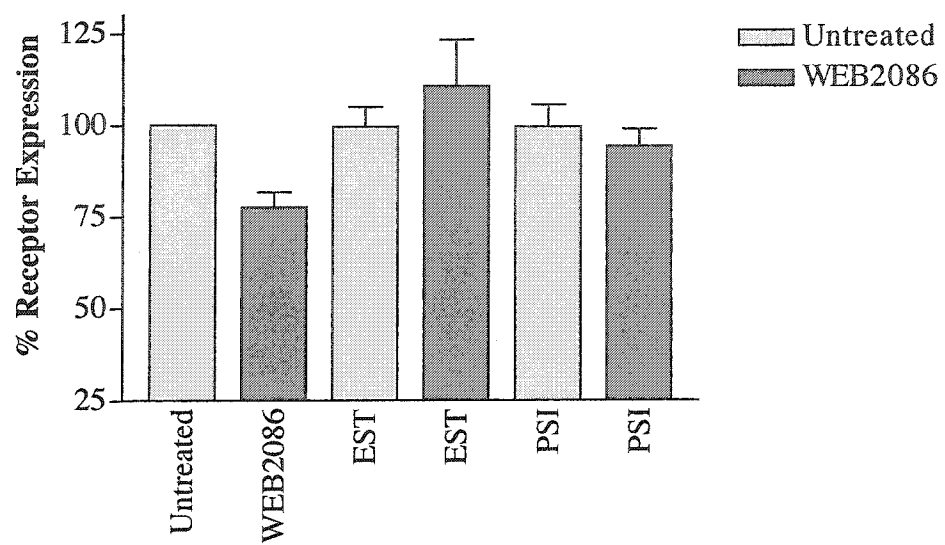


Figure 8

## CHAPITRE V – DISCUSSION

Les outils de communication intercellulaire ont permis aux cellules d'assurer leur subsistance en comblant leurs besoins primaires. L'activation de diverses protéines membranaires a entraîné chez les êtres uni- et multi-cellulaires, le développement, l'homéostasie ainsi que le transfert et l'intégration des messages extracellulaires. Une grande famille de protéines membranaires, les GPCRs, semble impliquée dans divers mécanismes de régulation cellulaire et pathologies (Peplow, 1999; Seifert et Wenzel-Seifert, 2002). Depuis plusieurs années, différents groupes ont tenté de comprendre les mécanismes d'activation et de contrôle de la réponse des GPCRs.

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse portent sur divers éléments du contrôle de réponses et signalisations induites par le récepteur humain liant le facteur activateur de plaquettes. La réponse cellulaire au PAF est associée à une signalisation via les protéines  $G_{\alpha q/i/o}$ , mais également à l'activation de différentes protéines kinases telles que la PKC, MAPK, src, FAK, JAK et GRK (Honda et al., 2002). En plus d'un rôle dans la signalisation, l'activation des kinases à seconds messagers (PKA et PKC) entraîne un contrôle de la réponse. La désensibilisation de la signalisation permet de restreindre dans le temps les effets d'une activation du récepteur suite à une stimulation courte, répétée ou prolongée. Le récepteur du PAF est sensible aux deux types de désensibilisation retrouvés, homologue et hétérologue, et se produit en partie par l'action de la protéine kinase C (Chao et al., 1990). L'action de cette kinase s'effectue à différents niveaux : les

PLC $\beta$  et  $\gamma$  sont impliquées dans la cascade de signalisation induite par le PAF et sont sensibles à une phosphorylation par la PKC (Ali et al., 1997). En effet, un inhibiteur des PKC a aboli la phosphorylation de la PLC $\beta$ 3 suite à une stimulation du récepteur par du PAF (Ali et al., 1997). Également, une phosphorylation induite par la PKC sur le récepteur du PAF semble suffisante pour induire le découplage du récepteur aux protéines G, permettant ainsi une désensibilisation homologue de la réponse au PAF (O'Flaherty et al., 1992). Cependant, il semble que la désensibilisation du récepteur du PAF ne procède pas uniquement par une phosphorylation par la PKC puisque des GRKs semblent impliquées (Takano et al., 1994). Cette phosphorylation se produit sur des résidus sérine/thréonine situés dans la queue cytoplasmique du récepteur du PAF, démontrant le rôle important de celle-ci dans la désensibilisation du PAFR (Takano et al., 1994).

#### **Activité constitutive des récepteurs à sept domaines transmembranaires : modèle pour l'identification d'agonistes inverses**

La désensibilisation de la signalisation se produit à la suite d'une activation par un ligand ou par une activité intrinsèque (constitutive) du récepteur. Certains récepteurs ayant une mutation les rendant constitutivement actifs sont impliqués dans le développement de maladies héréditaires graves. Par exemple, une mutation de la glycine en position 90 en aspartate du récepteur liant la rhodopsine donne lieu à des conditions de cécité nocturne congénitale ainsi qu'à la mort cellulaire et dégénérescence de la rétine (*retinitis pigmentosa*) (Dryja et al., 1993; Rao et al., 1994; Shokravi et Dryja, 1993). Des études *in vitro* ont démontré que plusieurs régions des GPCRs sont impliquées dans

l'obtention de mutations constitutives. Une mutation dans la portion C-terminale de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire des récepteurs adrénergiques et de plusieurs autres récepteurs permet d'obtenir un mutant constitutivement actif (Abadji et al., 1999; Lattion et al., 1999; Pauwels et Wurch, 1998; Ren et al., 1993). De façon analogue, une substitution de la leucine 231 de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du PAFR en arginine présente une hausse d'affinité pour l'agoniste de façon indépendante du couplage à la protéine G. Ces caractéristiques permettent la classification de ce récepteur mutant comme constitutivement actif. Lors du couplage à la protéine G, l'affinité de ce récepteur mutant est beaucoup plus élevée que celle du récepteur de type sauvage. Lorsque les récepteurs WT et L231R sont découplés de la protéine G, le récepteur mutant a une affinité 3 fois supérieure pour l'agoniste, tandis que le couplage permet une affinité pour le PAF qui est 30 fois supérieure à celle du récepteur de type sauvage (Parent et al., 1996a). La co-expression du récepteur de type sauvage avec le mutant découplé des protéines G D63N (substitution de l'aspartate 63 par une arginine) dans un ratio 1:3 a démontré que le niveau de base d'inositols phosphates produits est supérieur à celui du récepteur de type sauvage (WT) ou D63N seuls (Le Gouill et al., 1999). L'aspartate en position 63 du récepteur du PAF possède des caractéristiques particulières. Ce résidu est conservé dans 98% des 2<sup>e</sup> domaines transmembranaires des GPCRs (Probst et al., 1992). Il semble que ce résidu ait un rôle important dans la régulation de la liaison du ligand et dans le couplage du récepteur à ses voies de signalisation. Par exemple, cette mutation chez le récepteur à la sérotonine (5-HT<sub>2A</sub>) peut contrôler l'affinité pour l'agoniste et la modulation allostérique par le GTP ou le sodium (Sealfon et al., 1995). Les résultats ont démontré que l'aspartate est essentielle au couplage du PAFR aux protéines G, mais n'est

pas nécessaire pour la liaison de l'agoniste. Au contraire, la mutation de l'aspartate du récepteur en asparagine entraîne une augmentation de l'affinité pour l'agoniste. Également, la surexpression de protéines  $G_{\alpha q}$  avec un GPCR dans les cellules de mammifères permet d'augmenter le niveau basal de réponse, probablement en augmentant la probabilité qu'un récepteur vacant rencontre une protéine G, comme démontré préalablement avec les récepteurs muscarinique (m1, m3 et m5), à l'histamine H1 et 5-HT<sub>2A</sub> (Bakker et al., 2001; Burstein et al., 1997; Weiner et al., 2001). L'activité constitutive peut cependant être diminuée par une certaine classe de ligands, les agonistes inverses.

La propriété définissant les agonistes inverses consiste en leur capacité à inhiber l'activité spontanée des récepteurs. La théorie du fonctionnement des agonistes inverses suggère que ce type de ligand aurait une affinité plus élevée pour les récepteurs en conformation inactive (**R**) qu'active (**R\***) (Figure 3), favorisant ainsi une modification de l'équilibre entre les divers états conformationnels vers l'état inactif. Ce type de ligand permet donc une diminution de l'activité basale (Milligan et al., 1995). Malgré l'activité basale constitutive de certains récepteurs, le développement *in vitro* de récepteurs mutants constitutivement actifs représente un outil de recherche important dans l'étude des agonistes inverses (Lefkowitz et al., 1993; Seifert et Wenzel-Seifert, 2002). Il semble que les caractéristiques des agonistes inverses sont souvent plus apparentes dans des systèmes exprimant de hauts niveaux de récepteurs ayant une activité de base élevée. Des études *in vivo* avec des souris transgéniques surexprimant le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique spécifiquement dans le myocarde ont démontré l'activité agoniste inverse



de certains ligands. Le rythme cardiaque et l'indice de contractilité étaient stimulés de façon maximale en absence d'agoniste, mais le ICI118551 permettait une inhibition de ces activités de façon dépendante de la concentration du ligand (Bond et al., 1995).

Les souris transgéniques surexprimant le récepteur du PAF ont des phénotypes nuisibles en plusieurs aspects. L'expression du récepteur dans ces souris révèle une haute expression dans le coeur et les muscles squelettiques, expression d'intensité moyenne dans les yeux, la peau, la trachée et l'aorte, alors que des niveaux à peine détectables de récepteurs semblent exprimés dans le cerveau, le poumon, les neutrophiles, la rate, le rein, l'intestin grêle, l'utérus et les testicules (Ishii et Shimizu, 2000). Il semble que l'expression ubiquitaire du récepteur du PAF soit létale pour plusieurs embryons, laissant seulement ce patron d'expression du récepteur se poursuivre jusqu'à terme. La proportion de progéniture transgénique versus type sauvage (1 : 2,3) ne correspond pas à la distribution mendélienne attendue (1 : 1) lors d'un croisement entre souris mâles hétérozygotes et femelles de type sauvage. Les souris transgéniques démontrent également une hyper-réactivité bronchique congénitale en réponse au PAF inhalé (Ishii et al., 1997). Une bronchoconstriction est observée lors d'une stimulation au PAF et cause une résistance pulmonaire accrue. En réponse à une administration d'acide hydrochlorique intra-trachéale, les souris transgéniques ont présenté des symptômes de dommages pulmonaires (élasticité pulmonaire accrue, développement d'oedème pulmonaire, détérioration dans la capacité d'effectuer des échanges gazeux) beaucoup plus grands que les souris WT (Nagase et al., 1999). Une pigmentation anormale de la peau des oreilles et de la queue est observée chez les souris transgéniques; quelques-unes

arborant même des tumeurs mélanocytiques (Ishii et al., 1997). Une accélération de prolifération des kératinocytes a également été observée, mais un traitement avec le WEB2086, un ligand capable d'antagoniser la liaison du PAF à son récepteur, a permis de réduire le nombre de cellules en prolifération (Sato et al., 1999).

Les agonistes inverses, peuvent avoir des applications dans le cas des maladies causées par un récepteur constitutivement actif, mais également pour des maladies où des récepteurs sont surexprimés comme pour le récepteur de la dopamine D4 dans la schizophrénie. Puisqu'un antagoniste neutre ne fait que bloquer une réponse induite par un agoniste, une activité de base élevée de signalisation induite par un récepteur en absence d'un agoniste pourrait rendre la maladie résistante aux antagonistes neutres (Bond et al., 1995). Le chapitre II présente donc une étude caractérisant divers ligands du PAFR ayant des structures différentes, afin d'identifier des agonistes inverses. Ceux-ci pourraient potentiellement être utiles dans le traitement de maladies similaires à celles présentées préalablement chez les souris transgéniques, dans des cas où le récepteur du PAF serait exprimé à de hauts niveaux cellulaires.

Une très grande variété de molécules possèdent la capacité de lier le récepteur du PAF. Quelques représentants des diverses familles de molécules liant le récepteur ont été sélectionnés pour l'étude du chapitre II (Figure 2). On retrouve des molécules analogues au PAF, tel que le CV-3988 (Terashita et al., 1985) ou le 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phospho-(N, N, N-triméthyl)hexanolamine (Grigoriadis et Stewart, 1991); des molécules faisant partie de la famille des benzodiazépines telles que l'Alprazolam

(Kornecki et al., 1984) ou le WEB2086 (Casals-Stenzel et al., 1987); des ginkgolides comme le BN 52021 (Nunez et al., 1986); des diaryl-tétrahydrofuranes tels que le SM-10661 (Komuro et al., 1990) et le ( $\pm$ )-trans-2,5-bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1,3-dioxolane (Hashemi et al., 1993); ainsi que des ligands de familles structurales variées tels que l'octylonium bromide (Subissi et al., 1989) et le FR-49175 (Okamoto et al., 1986). Les ligands faisant partie de la famille des benzodiazépines se sont avérés les plus efficaces pour diminuer la réponse constitutive des récepteurs du PAF de type sauvage (WT +  $G_{\alpha q}$ ) ou mutant L231R avec environ 50% d'inhibition de la réponse en inositols phosphates. Les molécules de la famille des diaryl-tétrahydrofuranes possèdent également la capacité de diminuer la réponse constitutive en inositols phosphates du récepteur avec une efficacité légèrement moindre. L'analogue du PAF CV-3988 diminue l'activité constitutive du PAFR alors que le 1-0-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phospho-(N, N, N-triméthyl)hexanolamine agit comme un agoniste partiel en augmentant la réponse en inositols phosphates. Des résultats similaires avaient été observés pour l'agrégation plaquettaire et la production de réactifs oxygénés par des macrophages (Grigoriadis et Stewart, 1991). Le principe de base expliquant le phénomène des agonistes inverses prétend que la réponse d'un agoniste ou d'un agoniste inverse doit être bloquable par un antagoniste neutre. La réponse générée par les agonistes inverses de cette étude est bloquable par un antagoniste neutre, le BN 52021, tel que démontré avec la réponse au WEB2086. De plus, l'action de ces molécules se produit de façon dépendante de la concentration d'agoniste inverse présente lors de la stimulation. La réponse induite ne semble pas être équivalente pour tous les modèles de récepteurs constitutivement actifs et ce, pour tous les ligands étudiés.

Le modèle d'activation des GPCRs propose deux mécanismes pour expliquer l'activité agoniste inverse de divers ligands. Premièrement, les molécules démontrant une activité agoniste inverse ont une affinité préférentielle pour les récepteurs en conformation inactive **R** plutôt que sous conformation active **R\*** et permettent une diminution dans la proportion des récepteurs sous l'état actif. De plus, on retrouve une réduction du niveau basal d'activation des cascades de signalisation. Ce mécanisme a été démontré pour le ICI 118551 et le betaxolol, deux agonistes inverses du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (Samama et al., 1994). Un autre mécanisme suggère que l'activité agoniste inverse de diverses molécules provient d'une affinité préférentielle pour les récepteurs étant libres plutôt que les complexes récepteurs-protéine G, supprimant ainsi l'activité constitutive des récepteurs (Costa et al., 1992). Les résultats obtenus lors de l'utilisation de différents modèles de récepteurs du PAF constitutivement actifs suggèrent que l'activité agoniste inverse démontrée par un modèle de récepteur constitutivement actif ne sera pas nécessairement présente pour un autre modèle d'activation constitutive. Nos résultats démontrent que diverses molécules peuvent agir en tant qu'agonistes inverses pour le récepteur mutant L231R et pour le modèle de coexpression de la protéine  $G_{\alpha q}$  avec le récepteur de type sauvage, alors que cette réduction de l'activité basale est absente ou gravement altérée pour le complexe 1WT + 3D63N. Lorsque exprimés dans le ratio 1 : 3, le complexe de récepteurs WT et D63N perd la capacité de répondre adéquatement au PAF malgré le haut niveau basal d'inositols phosphates produits, indiquant la possibilité que la conformation acquise par ce complexe soit plus rigide, défavorisant ainsi le changement conformationnel occasionné par la liaison d'un agoniste

(Le Gouill et al., 1999). Toutefois, lorsque mesuré par cytométrie de flux, le nombre de récepteurs exprimés à la surface est similaire à ceux du récepteur de type sauvage exprimé seul (Le Gouill et al., 1999). Cette résistance au changement de conformation permettrait également d'expliquer les raisons pour lesquelles l'activité agoniste inverse est réduite pour toutes les molécules à l'étude avec ce modèle de récepteur constitutivement actif. De façon similaire, un récepteur mutant liant l'histamine (H2), présente une réponse limitée à l'histamine et ne permet pas l'activité agoniste inverse de manière semblable à celle obtenue par le récepteur de type sauvage (Smit et al., 1996).

L'action des agonistes inverses ne se traduit pas généralement par une augmentation du niveau d'internalisation des récepteurs, ce qui aurait pour effet de diminuer le nombre de récepteurs produisant une réponse. De plus, différents agonistes inverses permettent une augmentation des récepteurs exprimés à la surface de la cellule. À l'instar du récepteur H2 à l'histamine, les agonistes inverses du récepteur du PAF ne permettent pas une internalisation accrue du récepteur (Smit et al., 1996). Cependant, pour le récepteur de la cholecystokinine<sub>A</sub>, l'activité agoniste inverse de certains ligands permet une séquestration accrue des récepteurs exprimés à la surface cellulaire (Roettger et al., 1997). Pour le récepteur du PAF, seulement un agoniste (PAF) ou des agonistes partiels (1-0-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phospho-(N, N, N-triméthyl) hexanolamine et enantio-PAF) permettent une augmentation du taux de séquestration du récepteur.

Les résultats indiquent donc que des effets différents peuvent se produire selon le type de récepteur constitutivement actif utilisé. De plus, la diminution de la réponse ne se

produit pas par une augmentation des taux d'internalisation du récepteur. Il a été préalablement démontré que les caractéristiques pharmacologiques de certains ligands peuvent être modifiées selon son interaction avec des récepteurs homo- ou hétérodimériques (Jordan et Devi, 1999). L'étude des effets des agonistes inverses sur les différentes configurations homo- et hétéro-dimériques des GPCRs sera utile pour le développement de médicaments ciblant précisément une réponse. L'identification des voies de signalisation induites par les différents complexes homo-ou hétéro-dimériques devra être réalisée avant d'enclencher une intervention thérapeutique par des agonistes inverses, puisque ceux-ci semblent posséder des propriétés pharmacologiques variables selon le modèle d'activité constitutive étudié. Certains des ligands présentés précédemment possèdent des caractéristiques pharmacologiques cliniques plus intéressantes que d'autres.

L'Alprazolam et le WEB2086 ont tous deux des structures de types benzodiazépine. Le WEB2086 n'a cependant pas la capacité de lier les récepteurs aux benzodiazépines (Griffin et al., 1989). L'Alprazolam, aussi connu sous le nom de Xanax, exhibe des propriétés anxiolytiques qui seraient un effet secondaire lors d'un traitement en tant qu'agoniste inverse du récepteur du PAF (Deltito et al., 1991). L'utilisation du WEB2086 de façon thérapeutique s'avère spécifique au récepteur du PAF et présente peu d'effets subversifs, en comparaison à son homologue benzodiazépine. En plus de son efficacité à améliorer la condition de personnes asthmatiques, le WEB2086 peut agir favorablement pour atténuer l'inflammation observée lors de dermatites ou lors de pneumonies à pneumocoques et par la méningite (Cundell et al., 1995; Kemeny et al.,

1996). Le WEB2086 est présentement en phase clinique (phase II) chez la compagnie japonaise Santen en vue de son utilisation comme traitement pour les conjonctivites de type allergique afin d'éliminer les symptômes de congestion, oedème et démangeaisons. Récemment, de nouvelles avenues thérapeutiques pour le WEB2086 sont apparues puisque ce ligand du récepteur du PAF est capable d'induire la différenciation terminale de cellules humaines leucémiques de façon dépendante de la protéine kinase C. Un traitement impliquant l'utilisation du WEB2086 pourrait mener vers une thérapie pour la leucémie, par l'induction de la différenciation terminale des cellules cancéreuses (Cellai et al., 2002).

#### **Activation de voies de signalisation par un agoniste ou un agoniste inverse**

Suite à la stimulation par un ligand, le concept général des récepteurs propose une activation des récepteurs, la phosphorylation du récepteur ou de protéines adjacentes puis l'internalisation du récepteur afin de permettre une désensibilisation de la réponse (Ferguson, 2001). Nos résultats démontrent que l'internalisation observée suite à une stimulation au WEB2086 est comparable au niveau basal de circulation des récepteurs. Cependant, le WEB2086 semble activer une voie de signalisation du récepteur du PAF permettant la différenciation des cellules murines MELC (murine erythroleukemia cells), de cellules humaines K562, HEL et HL60 (lignée promyélocytique leucémique) (Cellai et al., 2002). Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des agonistes inverses et en particulier le contrôle des voies de signalisations induites par le WEB2086, nous avons tenté d'élucider le processus permettant la désensibilisation de la réponse à cet agoniste inverse. Les études présentées dans les chapitres III et IV démontrent les effets du

WEB2086 sur l'activation de différentes voies de signalisation comme l'activation de certaines isoformes de protéine kinase C ou de la synthèse de récepteurs, ainsi que sur la désensibilisation de la réponse induite par une activation du récepteur du PAF. De plus, une caractérisation des mécanismes utilisés lors de la désensibilisation à long terme de la réponse suite à une stimulation au PAF ou au WEB2086 est présentée.

La désensibilisation de la signalisation permet de restreindre dans le temps les effets d'une stimulation, qu'elle soit courte, répétée ou prolongée. Le récepteur du PAF est sensible à la désensibilisation par l'action de la protéine kinase C (Chao et al., 1990). Une phosphorylation du récepteur du PAF induite par la PKC semble suffisante pour induire le découplage du récepteur aux protéines G et permettre une désensibilisation homologue de la réponse au PAF (O'Flaherty et al., 1992). Le récepteur du PAF peut être phosphorylé après activation puisque la staurosporine, un inhibiteur de différentes kinases dont la PKC et la PKA, inhibe partiellement la phosphorylation du récepteur du PAF (Ali et al., 1994). Lors d'une stimulation des cellules COS-7 avec du PAF ou du WEB2086, on obtient une augmentation de la phosphorylation du récepteur du PAF. L'inhibiteur GF109203X, spécifique pour les protéines kinases C, permet l'abolition de 80% de la phosphorylation du récepteur lors d'une stimulation au WEB2086, alors qu'environ 40% de la phosphorylation induite par une stimulation au PAF est empêchée. Plusieurs isoformes de PKC existent et nous avons voulu vérifier la possibilité que des isoformes différentes puissent agir, selon le ligand ayant activé le récepteur. L'utilisation de protéines kinases C dominantes négatives a permis d'identifier les isoformes de PKC utilisées lors de la stimulation au PAF ou au WEB2086. Suite à une stimulation au



WEB2086, les isoformes  $\beta_{II}$ ,  $\theta$  et  $\zeta$  sont préférentiellement utilisées alors qu'une stimulation au PAF entraîne l'activation des isoformes  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$ . De plus, l'effet de PKC constitutivement actives a été mesuré pour la réponse en inositols phosphates. La PKC $\beta_{II}$  ainsi que la PKC $\alpha$  (à un niveau moindre) constitutivement active permet de bloquer les effets induits par une stimulation au WEB2086, alors que des isoformes de PKC différentes semblent agir pour une stimulation au PAF, soit les isoformes  $\delta$ ,  $\alpha$  et  $\epsilon$ . Une activation de l'isoforme PKC $\alpha$  a préalablement été démontrée suite à une stimulation au PAF lors du relâchement d'oxide nitrique (Dearn et al., 2000). Notre étude confirme les résultats de cette étude suggérant l'activation de la PKC $\alpha$  et suggère une activation potentielle d'autres isozymes, variant selon le type de réponse étudiée. Il y aurait donc une spécificité de signalisation différente selon le type de ligand activant le récepteur. Les effets rencontrés suite à une stimulation au WEB2086 semble en général se produire par l'action de la PKC $\beta_{II}$  alors qu'une stimulation au PAF favorise la PKC $\delta$ . Nous avons donc procédé à un essai kinase in vitro, à l'aide des protéines obtenues par une immunoprécipitation de PKC spécifiques ( $\beta_{II}$  et  $\delta$ ). Suite à une stimulation au WEB2086, l'activité kinase de la protéine PKC $\beta_{II}$  immunoprécipitée démontre une augmentation de la phosphorylation d'un substrat, la protéine myéline basique (MBP). Cet effet est bloquable par l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K, soit la wortmannin et le LY294002. Cependant, aucune augmentation de phosphorylation du substrat par la PKC $\beta_{II}$  n'est observée lors d'une stimulation au PAF. Lorsque l'essai kinase est effectué avec la PKC $\delta$ , le PAF permet une augmentation de la phosphorylation, mais cet effet n'est pas contré par l'inhibiteur de la PI3K (wortmannin). Ces résultats permettent donc une fois de plus de démontrer des différences dans les isoformes activées par le PAF et le

WEB2086. Ils viennent également préciser la voie d'activation de la PKC $\beta_{II}$  utilisée lors d'une stimulation au WEB2086. Une stimulation au WEB2086 permettrait l'activation de la PI3K, puis de la PKC $\beta_{II}$  pour divers effets sur le récepteur ou sur la signalisation de celui-ci. D'ailleurs, l'activation de la PKC $\beta_{II}$  par la PI3K a déjà été démontrée dans le phénomène de transport de glucose insulino-dépendent chez des cellules de muscle squelettique de rat (Braiman et al., 1999). Diverses voies peuvent lier l'activation de la PI3K avec les récepteurs. Par exemple, les G $\beta\gamma$  relâchées après activation peuvent stimuler l'activité catalytique de la sous-unité p110 $\gamma$  de la PI3K $\gamma$  (Walker et al., 1999). Également, la tyrosine kinase PYK2 peut activer Ras qui stimule directement la sous-unité p110 de la PI3K de classe IA (Murasawa et al., 1998; Sayed et al., 2000). La BTK (Bruton's tyrosine kinase) peut phosphoryler un adaptateur BCAP, permettant ainsi l'activation de PI3K suite à l'activation d'un récepteur (Okada et al., 2000). Le mécanisme à l'oeuvre pour l'activation de la PI3K suite à une stimulation au WEB2086 reste cependant à être précisé.

L'activation de PKC ne semble pas se produire uniquement par l'agoniste inverse WEB2086. Une autre étude suggère que le BN52021 peut également activer une PKC (Lenoir et al., 2002). Dans cette étude, le BN52021 est décrit comme un agoniste partiel puisque une production rapide et faible de réactifs oxygénés est observée. Nos résultats démontrent cependant que le BN52021 agit comme un agoniste inverse très faible sur la production d'inositols phosphate (Dupre et al., 2001). Pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, les ligand ICI118551 et propanolol qui sont des agonistes inverses pour l'activation de la l'adénylate cyclase, sont capables d'activer la réponse par les MAP kinases (Azzi et al.,

2003). Un même type de phénomène est observé avec l'agoniste inverse SR121463B du récepteur à la vasopressine V2 qui est capable d'induire une réponse par les kinases ERK1/2 (Azzi et al., 2003). Il est donc permis de croire que parmi les différentes voies de signalisation ou types cellulaires observés, un même ligand pourra jouer des rôles distincts, comme agoniste ou agoniste inverse.

Il semble cependant que la désensibilisation du PAFR suite à une stimulation au PAF ne procède pas uniquement par une phosphorylation par la PKC, puisque des GRKs semblent également être impliquées (Takano et al., 1994). L'action des GRKs permettrait d'expliquer l'inhibition partielle de la phosphorylation avec l'inhibiteur des protéines kinases C GF109203X.

Plusieurs voies de signalisation sont induites par une stimulation du récepteur du PAF. Par exemple, la transcription du gène du récepteur du PAF est augmentée en réponse à une stimulation au PAF, et ce dans plusieurs types cellulaires (Mutoh et al., 1994; Shirasaki et al., 1994). Il semble que cette augmentation de transcription puisse être à tout le moins en partie induite via l'activation de PKC permettant l'activation d'une voie de signalisation menant à la phosphorylation du facteur NF $\kappa$ B (Mutoh et al., 1994). Chez les monocytes isolés du sang de personnes saines, une augmentation transitoire d'environ 2,6 fois de l'ARN messager du récepteur du PAF se produit suite à une stimulation de 45 minutes au PAF ( $10^{-8}$ M). Préalablement, un autre groupe a démontré qu'une stimulation de 60 minutes induit une augmentation de l'ARN messager du PAFR de monocytes d'environ 2 fois et que cette augmentation est transitoire, puisque après

120 ou 180 minutes de stimulation, les taux d'ARN messenger sont semblables au niveau du contrôle (Shirasaki et al., 1994). Une stimulation au WEB2086 entraîne une très faible variation dans les niveaux de production d'ARN messenger du PAFR. Il semble donc que les effecteurs induits par les isoformes de PKC spécifiquement activées lors d'une stimulation au PAF ou au WEB2086 ne produisent pas les mêmes effets cellulaires.

L'effet à long terme des deux types de ligands sur l'expression des récepteurs semble être une diminution du nombre de récepteurs exprimés. En effet, une perte d'environ 35% du nombre de récepteurs exprimés par les monocytes isolés de personnes saines est observée suite à une stimulation de 5 heures au carbamyl-PAF. Les effets du WEB2086 sur l'expression du récepteur du PAF entraînent également une perte similaire de l'expression du PAFR membranaire chez les monocytes. L'effet global d'expression de récepteurs se traduit par un équilibre entre les niveaux de synthèse du PAFR et les taux de dégradation des protéines déjà exprimées. Généralement, les agonistes inverses ont une activité permettant l'augmentation de l'expression membranaire des récepteurs. Cependant, de rares exemples, observés pour la famille de récepteurs à la sérotonine, ont montré qu'il est possible pour un agoniste inverse d'induire une diminution de l'expression membranaire de récepteurs (Labrecque et al., 1995). Il semble donc que le WEB2086 ait des propriétés particulières quant à son effet sur l'expression des récepteurs, méritant d'être étudiées plus en détail.

Suite à une stimulation au PAF, le récepteur subit une endocytose dépendante des vésicules à clathrines, sous le contrôle de la dynamine et de l'arrestine (Chen et al., 2002;

Le Gouill et al., 1997). Les travaux de l'étude du chapitre II démontrent que l'internalisation observée suite à une stimulation au WEB2086 est comparable au niveau basal de circulation des récepteurs et que l'expression du récepteur du PAF semble régulée à la baisse. D'ailleurs, la cinétique de dégradation des récepteurs du PAF est similaire lors d'une stimulation prolongée au carbamyl-PAF ou au WEB2086, avec un effet maximal de 50% de dégradation chez les cellules COS-7 surexprimant le récepteur. Il semble également qu'une portion des récepteurs subit une endocytose constitutive vers la dégradation, puisque le niveau basal d'expression des récepteurs diminue au fil du temps. Lors d'une stimulation au WEB2086 ou au PAF, l'utilisation d'une protéine dominante négative de la dynamine (K44A) empêche la disparition des récepteurs exprimés. Cependant, une stimulation au WEB2086 n'induit pas la translocation de l'arrestine 2 vers une localisation membranaire concomittante au PAFR, phénomène observé lors de la stimulation au PAF (Chen et al., 2002). L'internalisation induite par le WEB2086 ne serait donc pas dépendante du même mécanisme d'endocytose. L'action de l'arrestine pourrait être remplacée par une autre protéine de tri endocytique telle que ARF6, connue pour son implication dans l'endocytose de certains GPCRs (Claing et al., 2001; Delaney et al., 2002; Naslavsky et al., 2003). De plus amples études seraient cependant nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.

Alors que les mécanismes d'endocytose et de recyclage du récepteur du PAF ont été caractérisés préalablement (Chen et al., 2002; Le Gouill et al., 1997), les voies de circulation intracellulaire menant à la dégradation du récepteur du PAF n'étaient encore que faiblement explorées. La voie de circulation intracellulaire du récepteur à la

transferrine est bien connue et sert de modèle pour la famille des GPCRs. Lors du niveau basal d'activation, les récepteurs du PAF et de la transferrine (TfnR) sont localisés à la membrane plasmique alors qu'après une stimulation par la transferrine (Tfn), le complexe Tfn-TfnR a une distribution vésiculaire. Après stimulation au PAF, une colocalisation du PAFR et du TfnR est observée, démontrant que le récepteur du PAF peut emprunter une voie similaire à celle du récepteur à la transferrine. Pour de nombreux récepteurs, la circulation cellulaire se produit suite au recrutement des vésicules à clathrines par les endosomes précoces, via l'action de GTPases telle Rab5. Il semble que Rab5 soit nécessaire pour la séquestration des récepteurs occupés par un ligand dans les vésicules endocytiques. Rab5 est impliquée dans la motilité vésiculaire en stimulant l'association des endosomes avec les microtubules en plus de favoriser l'arrimage et la fusion des vésicules aux endosomes avec l'aide d'un de ses effecteurs, soit la protéine EEAI (Christoforidis et al., 1999a; McLauchlan et al., 1998; Nielsen et al., 1999). L'utilisation d'une protéine dominante négative de Rab5 (S34N) a permis de révéler que la voie menant à la désensibilisation à long terme du récepteur du PAF stimulé au PAF est dépendante du passage aux endosomes précoces, puisque la protéolyse du récepteur est empêchée. Le récepteur du PAF colocalise d'ailleurs avec deux protéines dont la localisation cellulaire se situe aux endosomes précoces, soit Rab5 et EEAI. D'autres études ont démontré le rôle des protéines Rab dans le transport vésiculaire vers les endosomes précoces. Par exemple, la surexpression de protéines dominantes négatives de Rab5 chez les cellules neuroendocriniennes PC12 exprimant le récepteur m4 muscarinique produit un effet sur la localisation membranaire du récepteur en réduisant les taux d'internalisation et la taille des vésicules d'endocytose comprenant ce récepteur

(Volpicelli et al., 2001). L'expression de la GTPase Rab5 constitutivement active favorise la localisation intracellulaire du récepteur m4 et produit de larges vésicules dans lesquelles on retrouve le récepteur (Volpicelli et al., 2001). De plus, les GTPases Rab semblent réguler l'internalisation, la circulation intracellulaire et le recyclage du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique ainsi que la fusion des vésicules comprenant le récepteur à l'angiotensine II de type 1A (Seachrist et al., 2000; Seachrist et al., 2002). L'utilisation de protéines dominantes négatives de Rab5 et Rab7 démontre que le récepteur  $\kappa$ -opioïde humain utilise une voie de protéolyse des récepteurs qui soit dépendante des protéines Rab5 et Rab7 (Li et al., 2000). Lors d'une stimulation au WEB2086, la voie de circulation intracellulaire semble différente puisque la dégradation n'est pas contrée par la coexpression cellulaire du dominant négatif de la protéine Rab5. Nos résultats tendent donc à proposer que l'endocytose et la circulation intracellulaire du récepteur du PAF peut se produire via deux mécanismes distincts, selon le type de ligand utilisé. La voie de circulation intracellulaire utilisée par le PAFR suite à une stimulation au WEB2086 pourrait être similaire à celle utilisée lors de l'internalisation constitutive du récepteur en procédant par un mécanisme indépendant des arrestines. Des études plus approfondies seront nécessaires pour comprendre le processus impliqué. Par contre, la voie empruntée par le PAFR suite à une stimulation au PAF semble être celle empruntée par un grand nombre de récepteurs, procédant via les endosomes précoces puis tardifs vers la protéolyse.

La GTPase Rab7 est localisée au niveau des endosomes tardifs et est mobile de façon bidirectionnelle sur les microtubules (Chavrier et al., 1990; Somsel Rodman et

Wandinger-Ness, 2000). Il semble que l'inhibition de la GTPase Rab7 ne permet plus le transit des vésicules endosomales précoces vers les endosomes tardifs. En effet, on retrouve une accumulation de la cathepsin D lors de l'expression d'un mutant de Rab7 dans les endosomes précoces (Press et al., 1998). Certaines glycoprotéines virales normalement implantées dans la membrane plasmique doivent subir un clivage spécifique lors du transit entre les endosomes précoces et tardifs. L'expression d'un dominant négatif de Rab7 cause une accumulation des protéines virales aux endosomes précoces inhibant ainsi son clivage et indiquant que le transport vers les endosomes tardifs est empêché (Feng et al., 1995). L'utilisation de protéines dominantes négatives de Rab5 et Rab7 démontre que le récepteur  $\kappa$ -opioïde humain utilise une voie pour la protéolyse des récepteurs qui soit dépendante des protéines Rab5 et Rab7 (Li et al., 2000). Le récepteur du PAF semble également transiter vers les endosomes tardifs de façon dépendante de la GTPase Rab7. En effet, l'utilisation de la protéine dominante négative Rab7 mutée en la position 125 (N125I) prévient la dégradation du récepteur du PAF, suite à une stimulation à long terme au carbamyl-PAF. Les mécanismes utilisés par les récepteurs du PAF et  $\kappa$ -opioïde semblent être les mêmes pour la circulation intracellulaire.

Parmi les différents mécanismes permettant la protéolyse, deux phénomènes semblent privilégiés pour la dégradation de la majorité des protéines, soit la dégradation protéasomale et la dégradation lysosomale. Suite à un prétraitement avec des inhibiteurs des enzymes lysosomales ou de la voie de circulation intracellulaire menant aux lysosomes (EST ou chloroquine) ou des inhibiteurs du protéasome (PSI ou clastolactacystin), une inhibition de la dégradation protéique du récepteur du PAF est



observée. Il semble que la dégradation lysosomale soit impliquée de façon majoritaire suite à une stimulation au PAF alors que la dégradation via le protéasome induit une protéolyse partielle du récepteur du PAF. Lorsque les deux mécanismes sont bloqués simultanément, une inhibition totale de la dégradation du récepteur du PAF est observée. Un phénomène similaire est observé pour le récepteur le récepteur  $\kappa$ -opioïde (Li et al., 2000), ce qui démontre que ce mécanisme est utilisé par différents GPCRs pour leur dégradation. Lors d'une stimulation avec l'agoniste inverse WEB2086, la protéolyse du récepteur semble également se produire via différents mécanismes. En effet, des inhibiteurs des enzymes lysosomales ou du protéasome utilisés séparément bloquent presque entièrement la dégradation du récepteur du PAF. L'utilisation simultanée d'inhibiteurs des enzymes lysosomales et du protéasome ne semblent pas agir de façon synergistique ou additive, puisque aucun changement n'est observable entre les traitements seuls ou combinés. Il semble que les deux mécanismes puissent être utilisés de façon indépendante et chacun pourrait potentiellement être utilisé en absence de l'autre.

De nombreux autres récepteurs tels que le  $\beta_2$ -adrénergique, les récepteurs  $\kappa$ - et  $\delta$ -opioïde, le récepteur activé par les protéases (PAR-1) et le récepteur CXCR4 semblent dégradés par les lysosomes (Gagnon et al., 1998; Li et al., 2000; Marchese et Benovic, 2001; Moore et al., 1999; Tanowitz et Von Zastrow, 2002; Tsao et al., 2001; Wang et al., 2002). Les récepteurs  $\kappa$ - et  $\mu$ -opioïde sont dégradés par le protéasome après activation et endocytose des récepteurs à la membrane plasmique (Chaturvedi et al., 2001; Li et al., 2000). Le  $\beta_2$ -adrénergique et le récepteur  $\delta$ -opioïde peuvent également être dégradés par

le protéasome, mais seulement après le passage au réticulum endoplasmique, le mécanisme sous-jacent ne serait pas dépendant de l'endocytose en provenance de la membrane plasmique (Petaja-Repo et al., 2001). Également, il semble que les récepteurs CXCR4 et CCR5 soient «down-régulés» de la surface cellulaire par un mécanisme dépendant du protéasome. Il semble que le récepteur CCR5 puisse interagir directement avec la sous-unité  $\zeta$  du protéasome (Fernandis et al., 2002).

L'ubiquitination est un mécanisme bien connu de ciblage au protéasome de diverses protéines en vue de leur dégradation. Ces protéines sont marquées par l'attachement d'une queue de plusieurs protéines ubiquitines sur des résidus lysines qui sert de signal de ciblage pour la dégradation. La modification d'une protéine avec une chaîne polypeptidique d'ubiquitine peut être programmé génétiquement ou peut être acquise suite à une phosphorylation, à l'attachement d'une protéine adaptatrice ou par des dommages dus à la fragmentation, oxydation ou vieillissement (Hershko et Ciechanover, 1998; Laney et Hochstrasser, 1999; Strous et Govers, 1999; Wilkinson, 2000). L'ubiquitination ne joue cependant pas seulement un rôle dans le ciblage au protéasome. Un autre type d'ubiquitination, la mono-ubiquitination peut permettre le ciblage de protéines vers une dégradation lysosomiale comme observé dans le cas du récepteur CXCR4 (Marchese et Benovic, 2001). Dans ce cas, le récepteur semble subir une mono-ubiquitination suite à la stimulation du récepteur sur des résidus lysines de la queue cytoplasmique. Il semble également que tous les résidus lysines doivent être substitués afin d'empêcher l'ubiquitination du récepteur. Dans un autre cas, il semble que le ciblage vers la dégradation du récepteur  $\delta$ -opioïde soit indépendant de l'ubiquitination du

récepteur (Tanowitz et Von Zastrow, 2002). L'ubiquitination de protéines cytosoliques nécessaires à la circulation intracellulaire du récepteur pourrait cependant intervenir dans le phénomène. L'ubiquitination de protéines associées au récepteur a déjà été rapporté, comme dans le cas du récepteur à l'EGF où une fraction des protéines associées à l'endocytose du récepteur de l'EGF sont ubiquitinées (Bishop et al., 2002). Dans le cas du PAFR, une ubiquitination de base est observée et la stimulation du récepteur par un agoniste ou un agoniste inverse (PAF ou WEB2086) ne modifie aucunement le niveau d'ubiquitination du récepteur. Afin de s'assurer de l'efficacité de la machinerie d'ubiquitination dans nos cellules, une protéine dominante négative d'une ubiquitine ligase (Cbl) a été utilisée afin de bloquer le processus d'ubiquitination du récepteur du PAF. L'ubiquitine ligase Cbl est connue comme un important régulateur de l'ubiquitination et du ciblage au lysosome de diverses protéines membranaires dont le récepteur à l'EGF (Duan et al., 2003). De plus, il semble que l'effet de l'ubiquitination du récepteur à l'EGF se produise principalement au niveau du tri endosomal, puisque l'ubiquitination du récepteur n'est pas nécessaire à son internalisation (Duan et al., 2003). Lors d'une co-expression de l'ubiquitine ligase Cbl dominante négative (NCbl) avec le récepteur du PAF, une baisse du niveau de base d'ubiquitination du récepteur est observée. Il semble donc que la protéine Cbl ait un rôle dans l'ubiquitination du récepteur. Cependant, tout comme pour le récepteur à l'EGF, elle ne semble pas être impliquée dans le processus d'internalisation induite par le ligand puisque l'inhibition de l'ubiquitination se produit autant sur les cellules non stimulées que stimulées. De plus, la co-expression de NCbl avec le PAFR permet un blocage de la dégradation du récepteur alors que la coexpression de Cbl de type sauvage ne produit pas d'effet. L'ubiquitination

du récepteur du PAF pourrait être impliquée dans le ciblage de la dégradation basale, un processus naturel de recyclage des récepteurs, puisque le phénomène de dégradation et l'ubiquitination du récepteur semblent se produire de façon constitutive. Malgré les résultats suggérant l'implication de la mono-ubiquitination du récepteur dans le processus de dégradation, d'autres études seront nécessaires pour éclaircir les rôles de l'ubiquitination du PAFR ainsi que la régulation de ce phénomène.

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent que les agonistes inverses sont non seulement capables de diminuer une activité constitutive de récepteurs, mais également d'induire diverses voies de signalisation suite à l'activation du récepteur du PAF. Ainsi, l'utilisation d'agonistes inverses pourrait permettre la modification de certaines voies de signalisation, en induisant une cascade d'activation d'effecteurs différente de celles activées par un agoniste. Par exemple, le PAF induit des effecteurs menant à la relâche de calcium des réserves intracellulaires alors que le WEB2086 en est incapable. Cependant, les deux types de ligands induisent une perte d'expression du PAFR chez certains types cellulaires. Un contrôle de certaines activités des récepteurs (comme l'expression protéique membranaire ou activation de certaines voies de signalisation) serait donc possible et ces travaux présentent donc de nouvelles possibilités thérapeutiques pour les molécules ayant une activité agoniste inverse, tel que le WEB2086 ou des dérivés de cette molécule.

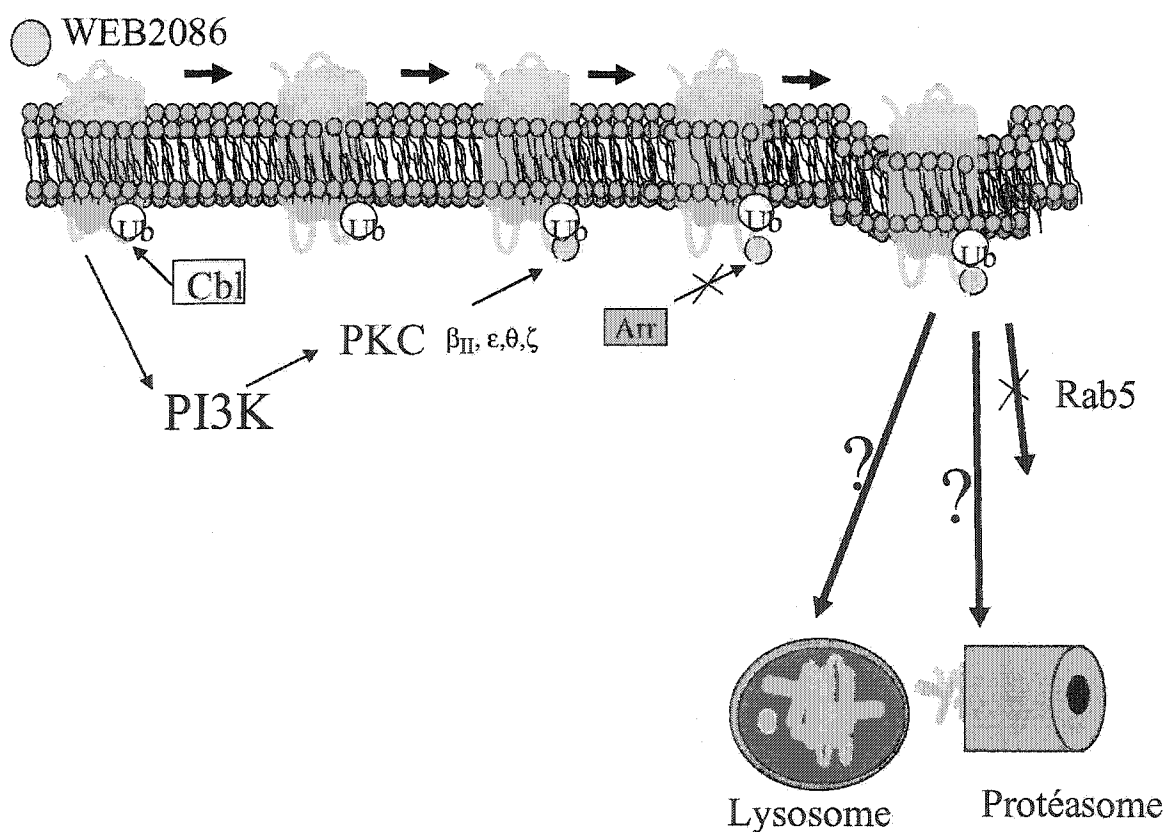
## VI - CONCLUSION

Les récepteurs couplés aux protéines G sont impliqués dans un très grand nombre de processus physiologiques et pathologiques. Une meilleure compréhension des mécanismes d'activation et de contrôle de la signalisation des récepteurs est essentielle afin de dresser un portrait de la biologie de ce type de récepteurs. Il sera possible de développer des outils spécifiques pour le traitement de certaines pathologies grâce à la mise en évidence des caractéristiques individuelles de chaque récepteur couplé aux protéines G.

Avec différents récepteurs constitutivement actifs, mutants ou complexes protéiques, nous avons pu démontrer que la réponse induite par des agonistes inverses ne mène pas nécessairement à une diminution de l'activité constitutive de base pour tous les modèles étudiés. Quelques complexes de récepteurs semblent insensibles à l'activation par des agonistes ou des agonistes inverses alors que d'autres sont sensibles à l'activation. Il en résulte alors une régulation différentielle de certains types de récepteurs par les ligands. Les effets des agonistes inverses sur la réponse des récepteurs couplés aux protéines G peuvent également être affectés par la capacité de former des complexes homo- ou hétérodimériques. L'activité des ligands sur ces complexes peut résulter en une modulation différente des capacités pharmacologiques comme préalablement observé pour les récepteurs  $\kappa$ - et  $\delta$ -opioïde (Jordan et Devi, 1999). L'étude des différentes configurations homo- et hétéro-dimériques des GPCRs ciblés pour une thérapie par des agonistes inverses devra être prise en considération avant

d'enclencher une intervention car divers effets indésirés pourraient surgir de l'activation de voies de signalisation non-ciblées.

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent que les agonistes inverses sont non seulement capables de diminuer une activité constitutive de récepteurs, mais certains, dont le WEB2086 peuvent également induire diverses voies de signalisation via l'activation du récepteur du PAF. L'induction de certaines de ces signalisations pourrait se produire de façon indépendante et différente de la cascade d'activation d'effecteurs induits par un agoniste. Par exemple, le PAF induit des effecteurs menant à la relâche de calcium des réserves intracellulaires, alors que le WEB2086 ne possède pas cette capacité. Cependant, les deux types de ligands induisent tous les deux une perte d'expression du PAFR chez certains types cellulaires. La Figure 5 présente un résumé



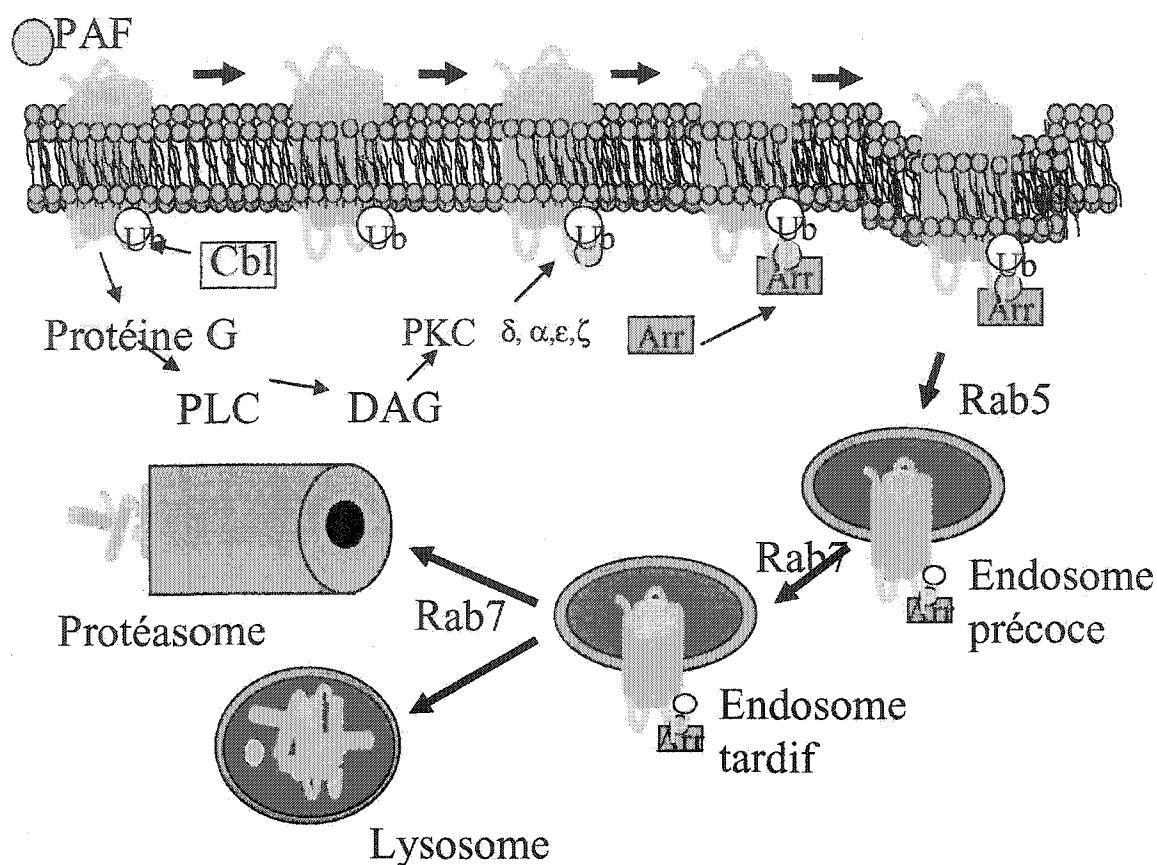


Figure 5. Résumé des résultats de circulation intracellulaire et de signalisation suite à une stimulation au WEB2086 (agoniste inverse) ou au PAF (agoniste).

des différents résultats obtenus lors des études des chapitre III et IV, à la suite d'une stimulation au PAF ou au WEB2086.

La régulation des voies de signalisation permettant le contrôle de l'expression membranaire des récepteurs présente de nouvelles possibilités thérapeutiques. Les molécules ayant une activité agoniste inverse, telle que le WEB2086 ou des dérivés de cette molécule pourront entraîner la diminution de l'expression des récepteurs, sans activer les voies normalement induites par le PAF. De plus, ces molécules pourront être

conçues pour cibler directement certaines voies de signalisation du récepteur afin de diminuer la suractivation de la réponse ou activer des voies différentes de celles utilisées lors d'une stimulation avec un agoniste.

Ces travaux permettent une meilleure compréhension des mécanismes de base de la régulation négative du PAFR et de la signalisation induite par les agonistes inverses. Ils pourront servir à la mise en place de modèles généraux de la régulation du récepteur et faciliteront le développement d'outils thérapeutiques ciblant efficacement une étape particulière de la signalisation du récepteur ou ayant des structures permettant des effets plus spécifiques.



## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier les Dr Jana Stankova et Marek Rola-Pleszczynski de m'avoir permis de faire mes travaux de maîtrise et de doctorat dans leur laboratoire.

Je voudrais remercier les Dr Richard Leduc, Jean-Luc Parent, Terence Hébert et Jana Stankova d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Merci à Dr Christian Le Gouill de m'avoir pris sous son aile à mes débuts en plus d'avoir participé activement à mes travaux de recherche. Tout chercheur devrait avoir quelqu'un comme lui à ses côtés tellement son aide est précieuse.

Merci à Denis Gingras d'avoir partagé la vie de laboratoire avec moi pendant toutes ces années. Son soutien et son amitié ont été des plus appréciés.

Merci à mes parents, Denis G. Dupré et Lucette Gélinas, pour leur appui et pour leur confiance inébranlable.

Finalement, je tiens à remercier mon épouse, Julie Saint-Mleux, qui m'a prodigué les encouragements nécessaires à la réalisation de ce travail. Elle a prononcé les paroles qui m'ont si souvent permis de retrouver le sourire et m'a aidé à relativiser les choses en me rappelant qu'il y a une vie en dehors du labo. Merci!

## BIBLIOGRAPHIE

- Abadji, V., Lucas-Lenard, J. M., Chin, C., and Kendall, D. A. (1999). Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of Gs. *J Neurochem* 72, 2032-2038.
- Alewijnse, A. E., Timmerman, H., Jacobs, E. H., Smit, M. J., Roovers, E., Cotecchia, S., and Leurs, R. (2000). The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H(2) receptor. *Mol Pharmacol* 57, 890-898.
- Ali, H., Fisher, I., Haribabu, B., Richardson, R. M., and Snyderman, R. (1997). Role of phospholipase C $\beta$ 3 phosphorylation in the desensitization of cellular responses to platelet-activating factor. *J Biol Chem* 272, 11706-11709.
- Ali, H., Richardson, R. M., Tomhave, E. D., DuBose, R. A., Haribabu, B., and Snyderman, R. (1994). Regulation of stably transfected platelet activating factor receptor in RBL-2H3 cells. Role of multiple G proteins and receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 269, 24557-24563.
- Allen, L. F., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., and Cotecchia, S. (1991). G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the  $\alpha$ 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11354-11358.
- Anborgh, P. H., Seachrist, J. L., Dale, L. B., and Ferguson, S. S. (2000). Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol* 14, 2040-2053.

- Authier, F., Posner, B. I., and Bergeron, J. J. (1996). Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett* 389, 55-60.
- Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Pineyro, G. (2003). Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11406-11411.
- Bais, C., Santomasso, B., Coso, O., Arvanitakis, L., Raaka, E. G., Gutkind, J. S., Asch, A. S., Cesarman, E., Gershengorn, M. C., Mesri, E. A., and Gerhengorn, M. C. (1998). G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* 391, 86-89.
- Baker, J. G., Hall, I. P., and Hill, S. J. (2003). Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol* 64, 1357-1369.
- Bakker, R. A., Schoonus, S. B., Smit, M. J., Timmerman, H., and Leurs, R. (2001). Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol* 60, 1133-1142.
- Baldwin, J. M., Schertler, G. F., and Unger, V. M. (1997). An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol* 272, 144-164.
- Benmerah, A., Poupon, V., Cerf-Bensussan, N., and Dautry-Varsat, A. (2000). Mapping of Eps15 domains involved in its targeting to clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 275, 3288-3295.

- Benveniste, J., Henson, P. M., and Cochrane, C. G. (1972). Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* 136, 1356-1377.
- Benveniste, J., Tence, M., Varenne, P., Bidault, J., Boulet, C., and Polonsky, J. (1979). [Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine]. *C R Seances Acad Sci D* 289, 1037-1040.
- Bishop, N., Horman, A., and Woodman, P. (2002). Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* 157, 91-101.
- Blanchard, S. G., Chang, K. J., and Cuatrecasas, P. (1983). Visualization of enkephalin receptors by image-intensified fluorescence microscopy. *Methods Enzymol* 103, 219-227.
- Blank, M. L., Lee, Y. J., Cress, E. A., and Snyder, F. (1988). Stimulation of the de novo pathway for the biosynthesis of platelet-activating factor (PAF) via cytidyltransferase activation in cells with minimal endogenous PAF production. *J Biol Chem* 263, 5656-5661.
- Blank, M. L., Snyder, F., Byers, L. W., Brooks, B., and Muirhead, E. E. (1979). Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun* 90, 1194-1200.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C., and Huber, R. (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 295-317.

- Bohm, S. K., Grady, E. F., and Bunnett, N. W. (1997). Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322 (*Pt 1*), 1-18.
- Bond, R. A., Leff, P., Johnson, T. D., Milano, C. A., Rockman, H. A., McMinn, T. R., Apparsundaram, S., Hyek, M. F., Kenakin, T. P., Allen, L. F., and et al. (1995). Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature* 374, 272-276.
- Braiman, L., Sheffi-Friedman, L., Bak, A., Tennenbaum, T., and Sampson, S. R. (1999). Tyrosine phosphorylation of specific protein kinase C isoenzymes participates in insulin stimulation of glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle. *Diabetes* 48, 1922-1929.
- Braquet, P., and Rola-Pleszczynski, M. (1987). The role of PAF in immunological responses: a review. *Prostaglandins* 34, 143-148.
- Braun, T., Schofield, P. R., and Sprengel, R. (1991). Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *Embo J* 10, 1885-1890.
- Bremnes, T., Paasche, J. D., Mehllum, A., Sandberg, C., Bremnes, B., and Attramadal, H. (2000). Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 275, 17596-17604.
- Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728.

- Burstein, E. S., Spalding, T. A., and Brann, M. R. (1997). Pharmacology of muscarinic receptor subtypes constitutively activated by G proteins. *Mol Pharmacol* 51, 312-319.
- Cao, T. T., Deacon, H. W., Reczek, D., Bretscher, A., and von Zastrow, M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401, 286-290.
- Casals-Stenzel, J., Muacevic, G., and Weber, K. H. (1987). Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J Pharmacol Exp Ther* 241, 974-981.
- Cellai, C., Laurenzana, A., Vannucchi, A. M., Della Malva, N., Bianchi, L., and Paoletti, F. (2002). Specific PAF antagonist WEB-2086 induces terminal differentiation of murine and human leukemia cells. *Faseb J* 16, 733-735.
- Ceresa, B. P., and Schmid, S. L. (2000). Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 12, 204-210.
- Chalmers, D. T., and Behan, D. P. (2002). The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics. *Nat Rev Drug Discov* 1, 599-608.
- Chanda, P. K., Minchin, M. C., Davis, A. R., Greenberg, L., Reilly, Y., McGregor, W. H., Bhat, R., Lubeck, M. D., Mizutani, S., and Hung, P. P. (1993). Identification of residues important for ligand binding to the human 5-hydroxytryptamine1A serotonin receptor. *Mol Pharmacol* 43, 516-520.
- Chang, P. Y., Luo, S., Jiang, T., Lee, Y. T., Lu, S. C., Henry, P. D., and Chen, C. H. (2001). Oxidized low-density lipoprotein downregulates endothelial basic fibroblast growth factor through a pertussis toxin-sensitive G-protein pathway: mediator role of platelet-activating factor-like phospholipids. *Circulation* 104, 588-593.

- Chao, W., Liu, H., Hanahan, D. J., and Olson, M. S. (1990). Regulation of platelet-activating factor receptor and PAF receptor-mediated arachidonic acid release by protein kinase C activation in rat Kupffer cells. *Arch Biochem Biophys* 282, 188-197.
- Chaturvedi, K., Bandari, P., Chinen, N., and Howells, R. D. (2001). Proteasome involvement in agonist-induced down-regulation of mu and delta opioid receptors. *J Biol Chem* 276, 12345-12355.
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., and Zerial, M. (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62, 317-329.
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V. I., Capua, M. R., Takei, K., Butler, M. H., Di Fiore, P. P., and De Camilli, P. (1998). Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* 394, 793-797.
- Chen, Z., Dupre, D. J., Le Gouill, C., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2002). Agonist-induced internalization of the platelet-activating factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein activation. Role of the C terminus and the (D/N)PXXY motif. *J Biol Chem* 277, 7356-7362.
- Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M., and Bouvier, M. (1994). Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* 45, 490-499.
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D., and Zerial, M. (1999a). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397, 621-625.
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S. C., Waterfield, M. D., Backer, J. M., and Zerial, M. (1999b). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* 1, 249-252.

- Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* 276, 42509-42513.
- Clapham, D. E., and Neer, E. J. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 167-203.
- Collins, S., Bouvier, M., Bolanowski, M. A., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1989). cAMP stimulates transcription of the beta 2-adrenergic receptor gene in response to short-term agonist exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4853-4857.
- Costa, T., Ogino, Y., Munson, P. J., Onaran, H. O., and Rodbard, D. (1992). Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory protein-linked receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol Pharmacol* 41, 549-560.
- Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., and Tuomanen, E. I. (1995). Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377, 435-438.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E., and Schmid, S. L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* 127, 915-934.
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T., and Mellman, I. (1996). Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9559-9564.



Dautzenberg, F. M., and Hauger, R. L. (2001). G-protein-coupled receptor kinase 3- and protein kinase C-mediated desensitization of the PACAP receptor type 1 in human Y-79 retinoblastoma cells. *Neuropharmacology* 40, 394-407.

Dearn, S., Rahman, M., Lewis, A., Ahmed, Z., Eggo, M. C., and Ahmed, A. (2000). Activation of platelet-activating factor (PAF) receptor stimulates nitric oxide (NO) release via protein kinase C-alpha in HEC-1B human endometrial epithelial cell line. *Mol Med* 6, 37-49.

Delaney, K. A., Murph, M. M., Brown, L. M., and Radhakrishna, H. (2002). Transfer of M2 muscarinic acetylcholine receptors to clathrin-derived early endosomes following clathrin-independent endocytosis. *J Biol Chem* 277, 33439-33446.

Deltito, J. A., Argyle, N., and Klerman, G. L. (1991). Patients with panic disorder unaccompanied by depression improve with alprazolam and imipramine treatment. *J Clin Psychiatry* 52, 121-127.

Demopoulos, C. A., Pinckard, R. N., and Hanahan, D. J. (1979). Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 254, 9355-9358.

Dhainaut, J. F., Tenaillon, A., Le Tulzo, Y., Schlemmer, B., Solet, J. P., Wolff, M., Holzapfel, L., Zeni, F., Dreyfuss, D., Mira, J. P., and et al. (1994). Platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 in the treatment of severe sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. BN 52021 Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 22, 1720-1728.

- Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60, 653-688.
- Doss, R. C., Perkins, J. P., and Harden, T. K. (1981). Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *J Biol Chem* 256, 12281-12286.
- Dryja, T. P., Berson, E. L., Rao, V. R., and Oprian, D. D. (1993). Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 4, 280-283.
- Duan, L., Miura, Y., Dimri, M., Majumder, B., Dodge, I. L., Reddi, A. L., Ghosh, A., Fernandes, N., Zhou, P., Mullane-Robinson, K., *et al.* (2003). Cbl-mediated ubiquitinylation is required for lysosomal sorting of epidermal growth factor receptor but is dispensable for endocytosis. *J Biol Chem* 278, 28950-28960.
- Dupre, D. J., Le Gouill, C., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2001). Inverse agonist activity of selected ligands of platelet-activating factor receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 358-365.
- Feng, W., and Song, Z. H. (2003). Effects of D3.49A, R3.50A, and A6.34E mutations on ligand binding and activation of the cannabinoid-2 (CB2) receptor. *Biochem Pharmacol* 65, 1077-1085.
- Feng, Y., Press, B., and Wandinger-Ness, A. (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 131, 1435-1452.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53, 1-24.

- Ferguson, S. S., Barak, L. S., Zhang, J., and Caron, M. G. (1996a). G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 74, 1095-1110.
- Ferguson, S. S., Downey, W. E., 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L., and Caron, M. G. (1996b). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271, 363-366.
- Ferguson, S. S., Menard, L., Barak, L. S., Koch, W. J., Colapietro, A. M., and Caron, M. G. (1995). Role of phosphorylation in agonist-promoted beta 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta ARK1. *J Biol Chem* 270, 24782-24789.
- Fernandis, A. Z., Cherla, R. P., Chernock, R. D., and Ganju, R. K. (2002). CXCR4/CCR5 down-modulation and chemotaxis are regulated by the proteasome pathway. *J Biol Chem* 277, 18111-18117.
- Fong, T. M., Yu, H., Huang, R. R., and Strader, C. D. (1992). The extracellular domain of the neurokinin-1 receptor is required for high-affinity binding of peptides. *Biochemistry* 31, 11806-11811.
- Franklin, R. A., Mazer, B., Sawami, H., Mills, G. B., Terada, N., Lucas, J. J., and Gelfand, E. W. (1993). Platelet-activating factor triggers the phosphorylation and activation of MAP-2 kinase and S6 peptide kinase activity in human B cell lines. *J Immunol* 151, 1802-1810.
- Franklin, R. A., Tordai, A., Mazer, B., Terada, N., Lucas, J., and Gelfand, E. W. (1995). Platelet activating factor activates MAPK and increases in intracellular calcium via

independent pathways in B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 1111-1118.

Fukunaga, K., Ishii, S., Asano, K., Yokomizo, T., Shiomi, T., Shimizu, T., and Yamaguchi, K. (2001). Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation. *J Biol Chem* 276, 43025-43030.

Gage, R. M., Kim, K. A., Cao, T. T., and von Zastrow, M. (2001). A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 276, 44712-44720.

Gagnon, A. W., Kallal, L., and Benovic, J. L. (1998). Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273, 6976-6981.

Garcia Rodriguez, C., Cundell, D. R., Tuomanen, E. I., Kolakowski, L. F., Jr., Gerard, C., and Gerard, N. P. (1995). The role of N-glycosylation for functional expression of the human platelet-activating factor receptor. Glycosylation is required for efficient membrane trafficking. *J Biol Chem* 270, 25178-25184.

Gardella, T. J., Luck, M. D., Jensen, G. S., Schipani, E., Potts, J. T., Jr., and Juppner, H. (1996). Inverse agonism of amino-terminally truncated parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide (PTHrP) analogs revealed with constitutively active mutant PTH/PTHrP receptors. *Endocrinology* 137, 3936-3941.

Goldenthal, K. L., Pastan, I., and Willingham, M. C. (1984). Initial steps in receptor-mediated endocytosis. The influence of temperature on the shape and distribution of plasma membrane clathrin-coated pits in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* 152, 558-564.

- Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.
- Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L. (1998). Role of arrestins in G-protein-coupled receptor endocytosis. *Adv Pharmacol* 42, 429-433.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J. (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64, 915-925.
- Griffin, K., Hong, T., and Levy, J. V. (1989). The benzodiazepine receptor ligands RO 5-4864 and RO 15-1788 do not block the inhibition of PAF-induced platelet aggregation seen with the hetrazepine WEB2086. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 263-267.
- Grigoriadis, G., and Stewart, A. G. (1991). 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phospho (N,N,N trimethyl) hexanolamine: an analogue of platelet-activating factor with partial agonist activity. *Br J Pharmacol* 104, 171-177.
- Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K., and Uchiyama, H. (1996). Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J Biol Chem* 271, 2776-2782.
- Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J., and Lefkowitz, R. J. (1998a). A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8496-8501.

- Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., *et al.* (1998b). The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature* 392, 626-630.
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273, 669-672.
- Hanahan, D. J. (1986). Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* 55, 483-509.
- Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Curtis, D. R., Wang, J. K., Juszczak, E., Fong, S. L., Rao, J. K., and Argos, P. (1983). The structure of bovine rhodopsin. *Biophys Struct Mech* 9, 235-244.
- Hashemi, S., Palmer, D. S., Aye, M. T., and Ganz, P. R. (1993). Platelet-activating factor secreted by DDAVP-treated monocytes mediates von Willebrand factor release from endothelial cells. *J Cell Physiol* 154, 496-505.
- Hausdorff, W. P., Bouvier, M., O'Dowd, B. F., Irons, G. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 264, 12657-12665.
- Hausdorff, W. P., Lohse, M. J., Bouvier, M., Liggett, S. B., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990). Two kinases mediate agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *Symp Soc Exp Biol* 44, 225-240.
- Heck, D. A., and Bylund, D. B. (1998). Differential down-regulation of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *Life Sci* 62, 1467-1472.
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J., and McNiven, M. A. (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141, 85-99.

- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hertel, C., Coulter, S. J., and Perkins, J. P. (1985). A comparison of catecholamine-induced internalization of beta-adrenergic receptors and receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor in human astrocytoma cells. Inhibition by phenylarsine oxide. *J Biol Chem* 260, 12547-12553.
- Hertel, C., Nunnally, M. H., Wong, S. K., Murphy, E. A., Ross, E. M., and Perkins, J. P. (1990). A truncation mutation in the avian beta-adrenergic receptor causes agonist-induced internalization and GTP-sensitive agonist binding characteristic of mammalian receptors. *J Biol Chem* 265, 17988-17994.
- Hewlett, L. J., Prescott, A. R., and Watts, C. (1994). The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol* 124, 689-703.
- Hicke, L. (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* 9, 107-112.
- Higgins, M. K., and McMahon, H. T. (2002). Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. *Trends Biochem Sci* 27, 257-263.
- Honda, Z., Ishii, S., and Shimizu, T. (2002). Platelet-activating factor receptor. *J Biochem (Tokyo)* 131, 773-779.
- Honda, Z., Takano, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Ito, K., and Shimizu, T. (1994). Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase kinase in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 269, 2307-2315.

Hurley, J. H., and Meyer, T. (2001). Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr Opin Cell Biol* 13, 146-152.

Hwang, S. B. (1990). Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanisms. *J Lipid Mediat* 2, 123-158.

Ibe, B. O., Sander, F. C., and Raj, J. U. (2000). Platelet-activating factor receptors in lamb lungs are downregulated immediately after birth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H1168-1176.

Inui, K. (1993). [Participation of platelet activating factor in the pulmonary injury during cardiopulmonary bypass]. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 41, 238-246.

Ishii, S., Nagase, T., Tashiro, F., Ikuta, K., Sato, S., Waga, I., Kume, K., Miyazaki, J., and Shimizu, T. (1997). Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. *Embo J* 16, 133-142.

Ishii, S., and Shimizu, T. (2000). Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 39, 41-82.

Izumi, T., Honda, Z., Mutoh, H., Kume, K., and Shimizu, T. (1995). Regulation and signal transduction of PAF receptor. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 23, 461-466.

Izumi, T., and Shimizu, T. (1995). Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1259, 317-333.

Ji, I., and Ji, T. H. (1991). Asp383 in the second transmembrane domain of the lutropin receptor is important for high affinity hormone binding and cAMP production. *J Biol Chem* 266, 14953-14957.



- Jockers, R., Angers, S., Da Silva, A., Benaroch, P., Strosberg, A. D., Bouvier, M., and Marullo, S. (1999). Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J Biol Chem* 274, 28900-28908.
- Jordan, B. A., and Devi, L. A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700.
- Kemeny, L., Trach, V., and Dobozy, A. (1996). Effect of locally applied WEB 2086, a platelet-activating factor antagonist, on inflammatory skin conditions in mice. *Arch Dermatol Res* 288, 492-494.
- Kenakin, T. (1996). The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol Rev* 48, 413-463.
- Kenakin, T. (2002). Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 349-379.
- Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 187-198.
- Ko, J. L., Arvidsson, U., Williams, F. G., Law, P. Y., Elde, R., and Loh, H. H. (1999). Visualization of time-dependent redistribution of delta-opioid receptors in neuronal cells during prolonged agonist exposure. *Brain Res Mol Brain Res* 69, 171-185.
- Kojro, E., and Fahrenholz, F. (1995). Ligand-induced cleavage of the V2 vasopressin receptor by a plasma membrane metalloproteinase. *J Biol Chem* 270, 6476-6481.
- Komuro, Y., Imanishi, N., Uchida, M., and Morooka, S. (1990). Biological effect of orally active platelet-activating factor receptor antagonist SM-10661. *Mol Pharmacol* 38, 378-384.

Kornecki, E., Ehrlich, Y. H., and Lenox, R. H. (1984). Platelet-activating factor-induced aggregation of human platelets specifically inhibited by triazolobenzodiazepines. *Science* 226, 1454-1456.

Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A., and Lefkowitz, R. J. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* 272, 5-8.

Kurzchalia, T. V., and Parton, R. G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11, 424-431.

Labrecque, J., Fargin, A., Bouvier, M., Chidiac, P., and Dennis, M. (1995). Serotonergic antagonists differentially inhibit spontaneous activity and decrease ligand binding capacity of the rat 5-hydroxytryptamine type 2C receptor in Sf9 cells. *Mol Pharmacol* 48, 150-159.

Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* 7, 661-671.

Laney, J. D., and Hochstrasser, M. (1999). Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97, 427-430.

Lattion, A., Abuin, L., Nenniger-Tosato, M., and Cotecchia, S. (1999). Constitutively active mutants of the beta1-adrenergic receptor. *FEBS Lett* 457, 302-306.

Law, P. Y., Hom, D. S., and Loh, H. H. (1982). Loss of opiate receptor activity in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment. A multiple-step process. *Mol Pharmacol* 22, 1-4.

- Law, P. Y., Hom, D. S., and Loh, H. H. (1984). Down-regulation of opiate receptor in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. Chloroquine promotes accumulation of tritiated enkephalin in the lysosomes. *J Biol Chem* 259, 4096-4104.
- Le Gouill, C., Parent, J. L., Caron, C. A., Gaudreau, R., Volkov, L., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1999). Selective modulation of wild type receptor functions by mutants of G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 274, 12548-12554.
- Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1997). Structural and functional requirements for agonist-induced internalization of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* 272, 21289-21295.
- Leff, P. (1995). The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 16, 89-97.
- Lefkowitz, R. J., Cotecchia, S., Samama, P., and Costa, T. (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* 14, 303-307.
- Lenoir, M., Pedruzzi, E., Rais, S., Drieu, K., and Perianin, A. (2002). Sensitization of human neutrophil defense activities through activation of platelet-activating factor receptors by ginkgolide B, a bioactive component of the Ginkgo biloba extract EGB 761. *Biochem Pharmacol* 63, 1241-1249.
- Li, J. G., Benovic, J. L., and Liu-Chen, L. Y. (2000). Mechanisms of agonist-induced down-regulation of the human kappa-opioid receptor: internalization is required for down-regulation. *Mol Pharmacol* 58, 795-801.

- Liu, B., Nakashima, S., Kanoh, H., Takano, T., Shimizu, T., and Nozawa, Y. (1994). Activation of phospholipase D in Chinese hamster ovary cells expressing platelet-activating factor receptor. *J Biochem (Tokyo)* 116, 882-891.
- Lohse, M. J. (1993). Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179, 171-188.
- Lu, R., Hubbard, J. R., Martin, B. R., and Kalimi, M. Y. (1993). Roles of sulfhydryl and disulfide groups in the binding of CP-55,940 to rat brain cannabinoid receptor. *Mol Cell Biochem* 121, 119-126.
- Lukashova, V., Asselin, C., Krolewski, J. J., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2001). G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* 276, 24113-24121.
- Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115, 455-465.
- MacLennan, K. M., Smith, P. F., and Darlington, C. L. (1996). Platelet-activating factor in the CNS. *Prog Neurobiol* 50, 585-596.
- Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Lacalle, R. A., Keller, P., Labrador, J. P., and Martinez, A. C. (1999). Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *Embo J* 18, 6211-6220.
- Marchese, A., and Benovic, J. L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276, 45509-45512.
- Martin, O. C., and Pagano, R. E. (1994). Internalization and sorting of a fluorescent analogue of glucosylceramide to the Golgi apparatus of human skin fibroblasts:

utilization of endocytic and nonendocytic transport mechanisms. *J Cell Biol* 125, 769-781.

McLauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osborne, A., West, M., and Smythe, E. (1998). A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr Biol* 8, 34-45.

Mellman, I. (2000). Quo vadis: polarized membrane recycling in motility and phagocytosis. *J Cell Biol* 149, 529-530.

Mellman, I., and Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100, 99-112.

Miller, W. E., Houtz, D. A., Nelson, C. D., Kolattukudy, P. E., and Lefkowitz, R. J. (2003). GRK phosphorylation and beta arrestin recruitment regulate the constitutive signaling activity of the human cytomegalovirus US28 GPCR. *J Biol Chem*.

Milligan, G. (1993). Agonist regulation of cellular G protein levels and distribution: mechanisms and functional implications. *Trends Pharmacol Sci* 14, 413-418.

Milligan, G., Bond, R. A., and Lee, M. (1995). Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci* 16, 10-13.

Montrucchio, G., Alloatti, G., and Camussi, G. (2000). Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 80, 1669-1699.

Moore, M. S., Mahaffey, D. T., Brodsky, F. M., and Anderson, R. G. (1987). Assembly of clathrin-coated pits onto purified plasma membranes. *Science* 236, 558-563.

Moore, R. H., Tuffaha, A., Millman, E. E., Dai, W., Hall, H. S., Dickey, B. F., and Knoll, B. J. (1999). Agonist-induced sorting of human beta2-adrenergic receptors to lysosomes during downregulation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 3), 329-338.

- Mukherjee, S., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* 77, 759-803.
- Mundell, S. J., Benovic, J. L., and Kelly, E. (1997). A dominant negative mutant of the G protein-coupled receptor kinase 2 selectively attenuates adenosine A2 receptor desensitization. *Mol Pharmacol* 51, 991-998.
- Murasawa, S., Mori, Y., Nozawa, Y., Masaki, H., Maruyama, K., Tsutsumi, Y., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Iwasaka, T., *et al.* (1998). Role of calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2/CAKbeta/RAFTK in angiotensin II induced Ras/ERK signaling. *Hypertension* 32, 668-675.
- Mutoh, H., Bito, H., Minami, M., Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Nakata, R., Kurachi, Y., Terano, A., and Shimizu, T. (1993). Two different promoters direct expression of two distinct forms of mRNAs of human platelet-activating factor receptor. *FEBS Lett* 322, 129-134.
- Mutoh, H., Ishii, S., Izumi, T., Kato, S., and Shimizu, T. (1994). Platelet-activating factor (PAF) positively auto-regulates the expression of human PAF receptor transcript 1 (leukocyte-type) through NF-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1137-1142.
- Nagase, T., Ishii, S., Kume, K., Uozumi, N., Izumi, T., Ouchi, Y., and Shimizu, T. (1999). Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J Clin Invest* 104, 1071-1076.
- Nagayama, Y., Tanaka, K., Hara, T., Namba, H., Yamashita, S., Taniyama, K., and Niwa, M. (1996). Involvement of G protein-coupled receptor kinase 5 in homologous desensitization of the thyrotropin receptor. *J Biol Chem* 271, 10143-10148.

- Nakamura, M., Honda, Z., Izumi, T., Sakanaka, C., Mutoh, H., Minami, M., Bito, H., Seyama, Y., Matsumoto, T., Noma, M., and et al. (1991). Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem* 266, 20400-20405.
- Naslavsky, N., Weigert, R., and Donaldson, J. G. (2003). Convergence of Non-clathrin- and Clathrin-derived Endosomes Involves Arf6 Inactivation and Changes in Phosphoinositides. *Mol Biol Cell* 14, 417-431.
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.
- Negro Alvarez, J. M., Miralles Lopez, J. C., Ortiz Martinez, J. L., Abellan Aleman, A., and Rubio del Barrio, R. (1997). Platelet-activating factor antagonists. *Allergol Immunopathol (Madr)* 25, 249-258.
- Nichols, B. J., and Lippincott-Schwartz, J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11, 406-412.
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A., and Zerial, M. (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol* 1, 376-382.
- Nunez, D., Chignard, M., Korth, R., Le Couedic, J. P., Norel, X., Spinnewyn, B., Braquet, P., and Benveniste, J. (1986). Specific inhibition of PAF-acether-induced platelet activation by BN 52021 and comparison with the PAF-acether inhibitors kadsurenone and CV 3988. *Eur J Pharmacol* 123, 197-205.
- Nurnberg, B., and Ahnert-Hilger, G. (1996). Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system. *FEBS Lett* 389, 61-65.

- Oekelen, D. V., Jurzak, M., Van de Wiel, D., Van Hecke, G., Luyten, W. H., and Leysen, J. E. (2001). Different regulation of rat 5-HT(2A) and rat 5-HT(2C) receptors in NIH 3T3 cells upon exposure to 5-HT and pipamperone. *Eur J Pharmacol* 425, 21-32.
- O'Flaherty, J. T., Jacobson, D. P., and Redman, J. F. (1992). Regulation of platelet-activating-factor receptors and the desensitization response in polymorphonuclear neutrophils. *Biochem J* 288 (Pt 1), 241-248.
- Oh, P., McIntosh, D. P., and Schnitzer, J. E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141, 101-114.
- Okada, T., Maeda, A., Iwamatsu, A., Gotoh, K., and Kurosaki, T. (2000). BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity* 13, 817-827.
- Okamoto, M., Yoshida, K., Uchida, I., Kohsaka, M., and Aoki, H. (1986). Studies of platelet activating factor (PAF) antagonists from microbial products. II. Pharmacological studies of FR-49175 in animal models. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 34, 345-348.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., *et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
- Palvimäki, E. P., Majasuo, H., Kuoppamäki, M., Mannisto, P. T., Syvalähti, E., and Hietala, J. (1998). Deramciclane, a putative anxiolytic drug, is a serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor inverse agonist but fails to induce 5-HT<sub>2C</sub> receptor down-regulation. *Psychopharmacology (Berl)* 136, 99-104.



- Parent, J. L., Le Gouill, C., de Brum-Fernandes, A. J., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1996a). Mutations of two adjacent amino acids generate inactive and constitutively active forms of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* *271*, 7949-7955.
- Parent, J. L., Le Gouill, C., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1996b). Mutation of an aspartate at position 63 in the human platelet-activating factor receptor augments binding affinity but abolishes G-protein-coupling and inositol phosphate production. *Biochem Biophys Res Commun* *219*, 968-975.
- Parent, J. L., Le Gouill, C. L., Escher, E., Rola-Pleszczynski, M., and Stakova, J. (1996c). Identification of transmembrane domain residues determinant in the structure-function relationship of the human platelet-activating factor receptor by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* *271*, 23298-23303.
- Parnot, C., Miserey-Lenkei, S., Bardin, S., Corvol, P., and Clauser, E. (2002). Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* *13*, 336-343.
- Pauwels, P. J., and Wurch, T. (1998). Review: amino acid domains involved in constitutive activation of G-protein-coupled receptors. *Mol Neurobiol* *17*, 109-135.
- Pearse, B. M., Smith, C. J., and Owen, D. J. (2000). Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr Opin Struct Biol* *10*, 220-228.
- Pelkmans, L., and Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic* *3*, 311-320.
- Peplow, P. V. (1999). Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* *61*, 65-82.

- Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P., and Bouvier, M. (2001). Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem* 276, 4416-4423.
- Pippig, S., Andexinger, S., and Lohse, M. J. (1995). Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol* 47, 666-676.
- Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., and McIntyre, T. M. (1990). Platelet-activating factor. *J Biol Chem* 265, 17381-17384.
- Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M., and McIntyre, T. M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69, 419-445.
- Press, B., Feng, Y., Hoflack, B., and Wandinger-Ness, A. (1998). Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J Cell Biol* 140, 1075-1089.
- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J., and Sealfon, S. C. (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 11, 1-20.
- Puri, V., Watanabe, R., Singh, R. D., Dominguez, M., Brown, J. C., Wheatley, C. L., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (2001). Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J Cell Biol* 154, 535-547.
- Radhakrishna, H., and Donaldson, J. G. (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol* 139, 49-61.

- Rands, E., Candelore, M. R., Cheung, A. H., Hill, W. S., Strader, C. D., and Dixon, R. A. (1990). Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *J Biol Chem* 265, 10759-10764.
- Rao, V. R., Cohen, G. B., and Oprian, D. D. (1994). Rhodopsin mutation G90D and a molecular mechanism for congenital night blindness. *Nature* 367, 639-642.
- Raposo, G., Dunia, I., Delavier-Klutchko, C., Kaveri, S., Strosberg, A. D., and Benedetti, E. L. (1989). Internalization of beta-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *Eur J Cell Biol* 50, 340-352.
- Rasmussen, S. G., Jensen, A. D., Liapakis, G., Ghanouni, P., Javitch, J. A., and Gether, U. (1999). Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6. *Mol Pharmacol* 56, 175-184.
- Reczek, D., Berryman, M., and Bretscher, A. (1997). Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* 139, 169-179.
- Ren, Q., Kurose, H., Lefkowitz, R. J., and Cotecchia, S. (1993). Constitutively active mutants of the alpha 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 268, 16483-16487.
- Rodriguez-Roisin, R., Felez, M. A., Chung, K. F., Barbera, J. A., Wagner, P. D., Cobos, A., Barnes, P. J., and Roca, J. (1994). Platelet-activating factor causes ventilation-perfusion mismatch in humans. *J Clin Invest* 93, 188-194.
- Roettger, B. F., Ghanekar, D., Rao, R., Toledo, C., Yingling, J., Pinon, D., and Miller, L. J. (1997). Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol* 51, 357-362.

- Roettger, B. F., Rentsch, R. U., Pinon, D., Holicky, E., Hadac, E., Larkin, J. M., and Miller, L. J. (1995). Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J Cell Biol* 128, 1029-1041.
- Rosenfeld, J. L., Knoll, B. J., and Moore, R. H. (2002). Regulation of G-protein-coupled receptor activity by rab GTPases. *Receptors Channels* 8, 87-97.
- Rosenkilde, M. M., Kledal, T. N., Brauner-Osborne, H., and Schwartz, T. W. (1999). Agonists and inverse agonists for the herpesvirus 8-encoded constitutively active seven-transmembrane oncogene product, ORF-74. *J Biol Chem* 274, 956-961.
- Rosenkilde, M. M., and Schwartz, T. W. (2000). Potency of ligands correlates with affinity measured against agonist and inverse agonists but not against neutral ligand in constitutively active chemokine receptor. *Mol Pharmacol* 57, 602-609.
- Roth, B. L., Willins, D. L., and Kroeze, W. K. (1998). G protein-coupled receptor (GPCR) trafficking in the central nervous system: relevance for drugs of abuse. *Drug Alcohol Depend* 51, 73-85.
- Rubino, M., Miaczynska, M., Lippe, R., and Zerial, M. (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem* 275, 3745-3748.
- Sakmar, T. P. (2002). Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. *Curr Opin Cell Biol* 14, 189-195.
- Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., and Lefkowitz, R. J. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 268, 4625-4636.

- Samama, P., Pei, G., Costa, T., Cotecchia, S., and Lefkowitz, R. J. (1994). Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 45, 390-394.
- Santini, F., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Benovic, J. L., and Keen, J. H. (2000). Selective recruitment of arrestin-3 to clathrin coated pits upon stimulation of G protein-coupled receptors. *J Cell Sci* 113 (Pt 13), 2463-2470.
- Sato, S., Kume, K., Ito, C., Ishii, S., and Shimizu, T. (1999). Accelerated proliferation of epidermal keratinocytes by the transgenic expression of the platelet-activating factor receptor. *Arch Dermatol Res* 291, 614-621.
- Savarese, T. M., and Fraser, C. M. (1992). In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* 283 (Pt 1), 1-19.
- Sayed, M. R., Sheid, M. P., Stevens, C. M., and Duronio, V. (2000). Thrombin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in platelets is associated with activation of PYK2 tyrosine kinase: activation of both enzymes is aggregation independent. *J Cell Physiol* 183, 314-320.
- Scheer, A., Fanelli, F., Costa, T., De Benedetti, P. G., and Cotecchia, S. (1996). Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *Embo J* 15, 3566-3578.
- Scheer, A., Fanelli, F., Costa, T., De Benedetti, P. G., and Cotecchia, S. (1997). The activation process of the alpha1B-adrenergic receptor: potential role of protonation and hydrophobicity of a highly conserved aspartate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 808-813.

Schwertschlag, U. S., and Whorton, A. R. (1988). Platelet-activating factor-induced homologous and heterologous desensitization in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 263, 13791-13796.

Schwiebert, E. M., Karlson, K. H., Friedman, P. A., Dietl, P., Spielman, W. S., and Stanton, B. A. (1992). Adenosine regulates a chloride channel via protein kinase C and a G protein in a rabbit cortical collecting duct cell line. *J Clin Invest* 89, 834-841.

Seachrist, J. L., Anborgh, P. H., and Ferguson, S. S. (2000). beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *J Biol Chem* 275, 27221-27228.

Seachrist, J. L., Laporte, S. A., Dale, L. B., Babwah, A. V., Caron, M. G., Anborgh, P. H., and Ferguson, S. S. (2002). Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *J Biol Chem* 277, 679-685.

Sealfon, S. C., Chi, L., Ebersole, B. J., Rodic, V., Zhang, D., Ballesteros, J. A., and Weinstein, H. (1995). Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *J Biol Chem* 270, 16683-16688.

Seifert, R., and Wenzel-Seifert, K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366, 381-416.

Shenker, A., Laue, L., Kosugi, S., Merendino, J. J., Jr., Minegishi, T., and Cutler, G. B., Jr. (1993). A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 365, 652-654.

- Shirasaki, H., Adcock, I. M., Kwon, O. J., Nishikawa, M., Mak, J. C., and Barnes, P. J. (1994). Agonist-induced up-regulation of platelet-activating factor receptor messenger RNA in human monocytes. *Eur J Pharmacol* 268, 263-266.
- Shokravi, M. T., and Dryja, T. P. (1993). Retinitis pigmentosa and the rhodopsin gene. *Int Ophthalmol Clin* 33, 219-228.
- Shryock, J. C., Ozeck, M. J., and Belardinelli, L. (1998). Inverse agonists and neutral antagonists of recombinant human A1 adenosine receptors stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 53, 886-893.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Smit, M. J., Leurs, R., Alewijnse, A. E., Blauw, J., Van Nieuw Amerongen, G. P., Van De Vrede, Y., Roovers, E., and Timmerman, H. (1996). Inverse agonism of histamine H2 antagonist accounts for upregulation of spontaneously active histamine H2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6802-6807.
- Snyder, F., Lee, T. C., and Blank, M. L. (1989). Platelet-activating factor and related ether lipid mediators. Biological activities, metabolism, and regulation. *Ann N Y Acad Sci* 568, 35-43.
- Soldi, R., Sanavio, F., Aglietta, M., Primo, L., Defilippi, P., Marchisio, P. C., and Bussolino, F. (1996). Platelet-activating factor (PAF) induces the early tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) in human endothelial cells. *Oncogene* 13, 515-525.
- Somseil Rodman, J., and Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* 113 Pt 2, 183-192.

- Spadoni, G., Balsamini, C., Bedini, A., Diamantini, G., Di Giacomo, B., Tontini, A., Tarzia, G., Mor, M., Plazzi, P. V., Rivara, S., *et al.* (1998). 2-[N-Acylamino(C1-C3)alkyl]indoles as MT1 melatonin receptor partial agonists, antagonists, and putative inverse agonists. *J Med Chem* 41, 3624-3634.
- Strous, G. J., and Govers, R. (1999). The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* 112 (Pt 10), 1417-1423.
- Strous, G. J., van Kerkhof, P., Govers, R., Ciechanover, A., and Schwartz, A. L. (1996). The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *Embo J* 15, 3806-3812.
- Subissi, A., Del Monte, M., Evangelista, S., Santicioli, P., and Criscuoli, M. (1989). Octylonium bromide, an antagonist of platelet-activating factor. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 302, 255-267.
- Takano, T., Honda, Z., Sakanaka, C., Izumi, T., Kameyama, K., Haga, K., Haga, T., Kurokawa, K., and Shimizu, T. (1994). Role of cytoplasmic tail phosphorylation sites of platelet-activating factor receptor in agonist-induced desensitization. *J Biol Chem* 269, 22453-22458.
- Tamura, G., Takishima, T., Mue, S., Makino, S., Itoh, K., Miyamoto, T., Shida, T., and Nakajima, S. (1996). Effect of a potent platelet-activating factor antagonist, WEB-2086, on asthma. A multicenter, double-blind placebo-controlled study in Japan. *Adv Exp Med Biol* 416, 371-380.
- Tanowitz, M., and Von Zastrow, M. (2002). Ubiquitination-independent Trafficking of G Protein-coupled Receptors to Lysosomes. *J Biol Chem* 277, 50219-50222.



- Terashita, Z., Imura, Y., and Nishikawa, K. (1985). Inhibition by CV-3988 of the binding of [3H]-platelet activating factor (PAF) to the platelet. *Biochem Pharmacol* 34, 1491-1495.
- Thivierge, M., Parent, J. L., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (1996). Modulation of human platelet-activating factor receptor gene expression by protein kinase C activation. *J Immunol* 157, 4681-4687.
- Tholanikunnel, B. G., and Malbon, C. C. (1997). A 20-nucleotide (A + U)-rich element of beta2-adrenergic receptor (beta2AR) mRNA mediates binding to beta2AR-binding protein and is obligate for agonist-induced destabilization of receptor mRNA. *J Biol Chem* 272, 11471-11478.
- Trejo, J., and Coughlin, S. R. (1999). The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J Biol Chem* 274, 2216-2224.
- Tsao, P., Cao, T., and von Zastrow, M. (2001). Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22, 91-96.
- van Biesen, T., Hawes, B. E., Raymond, J. R., Luttrell, L. M., Koch, W. J., and Lefkowitz, R. J. (1996). G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* 271, 1266-1269.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

- Vickery, R. G., and von Zastrow, M. (1999). Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J Cell Biol* 144, 31-43.
- Volpicelli, L. A., Lah, J. J., and Levey, A. I. (2001). Rab5-dependent trafficking of the m4 muscarinic acetylcholine receptor to the plasma membrane, early endosomes, and multivesicular bodies. *J Biol Chem* 276, 47590-47598.
- Walker, E. H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L., and Williams, R. L. (1999). Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* 402, 313-320.
- Wang, H. Y., Berrios, M., and Malbon, C. C. (1989). Localization of beta-adrenergic receptors in A431 cells in situ. Effect of chronic exposure to agonist. *Biochem J* 263, 533-538.
- Wang, Y., Zhou, Y., Szabo, K., Haft, C. R., and Trejo, J. (2002). Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. *Mol Biol Cell* 13, 1965-1976.
- Weiner, D. M., Burstein, E. S., Nash, N., Croston, G. E., Currier, E. A., Vanover, K. E., Harvey, S. C., Donohue, E., Hansen, H. C., Andersson, C. M., *et al.* (2001). 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor inverse agonists as antipsychotics. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 268-276.
- Weiss, J. M., Morgan, P. H., Lutz, M. W., and Kenakin, T. P. (1996). The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J Theor Biol* 181, 381-397.
- Wilkinson, K. D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 11, 141-148.

- Xie, J., Murone, M., Luoh, S. M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J. M., Lam, C. W., Hynes, M., Goddard, A., *et al.* (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90-92.
- Xu, J., Ziemnicka, D., Merz, G. S., and Kotula, L. (2000). Human spectrin Src homology 3 domain binding protein 1 regulates macropinocytosis in NIH 3T3 cells. *J Cell Sci* 113 Pt 21, 3805-3814.
- Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., and Wigler, M. (1986). Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 45, 711-719.
- Yue, T. L., Gu, J. L., and Feuerstein, G. (1992a). Protein kinase C activator phorbol 12, 13-dibutyrate inhibits platelet activating factor-stimulated  $Ca^{2+}$  mobilization and phosphoinositide turnover in neurohybrid NG108-15 cells. *Neurochem Res* 17, 997-1004.
- Yue, T. L., Stadel, J. M., Sarau, H. M., Friedman, E., Gu, J. L., Powers, D. A., Gleason, M. M., Feuerstein, G., and Wang, H. Y. (1992b). Platelet-activating factor stimulates phosphoinositide turnover in neurohybrid NCB-20 cells: involvement of pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins and inhibition by protein kinase C. *Mol Pharmacol* 41, 281-289.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 107-117.
- Zhang, J., Barak, L. S., Anborgh, P. H., Laporte, S. A., Caron, M. G., and Ferguson, S. S. (1999). Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* 274, 10999-11006.

Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Bodduluri, S. R., Laporte, S. A., Law, P. Y., and Caron, M. G. (1998). Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7157-7162.

Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Menard, L., and Caron, M. G. (1996). Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 271, 18302-18305.

Zhou, X. M., and Fishman, P. H. (1991). Desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of the cyclic AMP-dependent but not a receptor-specific protein kinase. *J Biol Chem* 266, 7462-7468.

Zhuang, Q., Bastien, Y., and Mazer, B. D. (2000). Activation via multiple signaling pathways induces down-regulation of platelet-activating factor receptors on human B lymphocytes. *J Immunol* 165, 2423-2431.

Zhukovskaya, N. L., and Neumaier, J. F. (2000). Clozapine downregulates 5-hydroxytryptamine<sub>6</sub> (5-HT<sub>6</sub>) and upregulates 5-HT<sub>7</sub> receptors in HeLa cells. *Neurosci Lett* 288, 236-240.

Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M. (1996). Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. *J Clin Invest* 98, 1699-1702.